



ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΚΥΤΤΑΡΟΥ

ESTROGEN RECEPTORS AS KEY FACTORS IN THE REGULATION OF THE  
PATHOPHYSIOLOGY OF THE CELL

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Άννα-Μαρία Ψαρρά (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)**

*Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

**Δημήτριος Λεωνίδας**

*Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

**Μιχαήλ Αλέξης**

*Ερευνητής Α του Ινστιτούτου Βιολογίας Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών*

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Άννα-Μαρία Ψαρρά**

*Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

**Δημήτριος Λεωνίδας**

*Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

**Μιχαήλ Αλέξης**

*Ερευνητής Α του Ινστιτούτου Βιολογίας Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών*

**Θεοδώρα Χολή- Παπαδοπούλου**

*Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης*

**Ζήσης Μαμούρης**

*Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

**Ευαγγελία Πρωτόπαπα**

*Καθηγήτρια του Τμήματος Αισθητικής και Κοσμητολογίας του ΤΕΙ Αθήνας, Διευθύντρια της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας Πρόνοιας του ΤΕΙ Αθήνας*

**Νικόλαος Μπαλατσός**

*Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

Γοργολιέτας Βύρων

ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΚΥΤΤΑΡΟΥ

ESTROGEN RECEPTORS AS KEY FACTORS IN THE REGULATION OF THE  
PATHOPHYSIOLOGY OF THE CELL



Γοργογιέτας Βύρων

ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Διδακτορική Διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: XII

Συνολικός αριθμός σελίδων: 190

Αριθμός πινάκων: 6

Αριθμός εικόνων: 39

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 364

## *Ευχαριστίες.....*

Η διδακτορική διατριβή αποτελεί ένα μακρινό ταξίδι και όπως καθετί στη ζωή, έτσι και η πορεία που καλείται ο καθένας να διανύσει είναι γλυκόπικρη, αλλά πάντα μα πάντα μοναδική και συναρπαστική. Το ταξίδι αυτό το συνειδητοποιείς μόνο στο τέλος του. Στο τέλος του αντιλαμβάνεσαι τι έχεις καταφέρει, με ποιον τρόπο και για ποιο λόγο. Και φυσικά στο τέλος μπορείς να εκτιμήσεις όλους εκείνους που σε συντρόφευσαν σε αυτή τη πορεία, με τον δικό του ρόλο ο καθένας (και αυτό αποτελεί έναν ακόμη λόγο που πάντα μα πάντα οι ευχαριστίες γράφονται τελευταίες..... λίγο διαφορετική διάθεση από όλο την υπόλοιπη διδακτορική διατριβή).

Αρχικά, θα ήθελα ειλικρινά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, Επίκουρη Καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά, πρώτα από όλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από τη πρώτη στιγμή, για την δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με τη μαγεία της έρευνας αλλά πάνω από όλα για τον τρόπο σκέψης που μου μεταλαμπάδευσε. Φυσικά, (και χωρίς να αποτελεί κλισέ), θα ήθελα να την ευχαριστήσω τόσο για τις γνώσεις και τις ιδέες που μοιράστηκε μαζί μου όσο και για την ηθική και πνευματική της καθοδήγηση.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα, για την ενεργή συνεισφορά του στην πραγμάτωση της διατριβής, την υποστήριξη του σε θέματα ακαδημαϊκά και μη, αλλά και για τις συζητήσεις (ουκ ω λίγες), τις οποίες πραγματοποιήσαμε σε όλη διάρκεια της διατριβής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, επίσης, θα ήθελα να εκφράσω στον Ερευνητή Α, Μιχαήλ Αλέξη, αφενός για την αποδοχή και ταυτόχρονα για την τιμή που μου έδωσε συμμετέχοντας στη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, αφετέρου για την προθυμία και την αμεσότητα, με την οποία με αντιμετώπισε από την πρώτη μας κιόλας γνωριμία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ (ειλικρινές και αυτό) θα ήθελα να πω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: (αρχίζοντας από τις κυρίες) στην Καθηγήτρια Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου, για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχει στη διδακτορική μου διατριβή, στην Καθηγήτρια Ευαγγελία Πρωτόπαπα, για την καρποφόρα και αρμονική επιστημονική συνεργασία μας και τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη και τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό, αφενός για την συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, αλλά πάνω από όλα αποτέλεσαν καθηγητές μου καθόλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου ζωής, καθώς υπήρξα φοιτητής τους από την πρώτη κιόλας μέρα στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και μου έδωσαν όλα τα εφόδια για αυτό το ταξίδι.

Ένα θερμό ευχαριστώ στους Διδάκτορες Αναστασία Καντσάδη και Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου, αλλά και στον υποψήφιο Διδάκτορα Αθανάσιο Κυρίτση, για την βοήθειά τους στα πρώτα βήματα αυτού του ταξιδιού αλλά και για την τύχη που είχα

να τους γνωρίσω βαθύτερα στην κοινή μας πορεία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιώργο Στραβοδότη για την συνεργασία μας όλο αυτό τον καιρό. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο (για λίγο ακόμα) Διδάκτορα Θεμιστοκλή Γιαννούλη, αφενός για την βοήθειά του και τους προβληματισμούς που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια, αφετέρου για τις πάρα πολλές (μη ακαδημαϊκές φυσικά) στιγμές που ζήσαμε. Επίσης, ευχαριστώ ολόψυχα τους Διδάκτορες Κωνσταντίνο Καραγκούνη, Παναγιώτη Καρρά για τις ατελείωτες στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός σχολής, μα πάνω από όλα για τη χαρά του να γνωρίζεις αξιόλογους ανθρώπους. Επίσης, (είναι αρκετοί ακόμα αυτοί που τους χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ, όπως θα παρατηρήσετε) θέλω να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Στυλιανό Καρούλια για την συμπαράστασή του, την κατανόησή του και τη βαθιά φιλία που μας ενώνει από τη πρώτη μέρα στη σχολή. Θέλω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Ιωάννη Τσιάλτα για την τέλεια συνεργασία που αναπτύχθηκε γρήγορα (και προέκυψε μια φιλία) και για τις ιδιαίτερα ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε στη σχολή, καθώς και την υποψήφια Διδάκτορα Αικατερίνη Καρρά για την άψογη συνεργασία μας και την κατανόηση της και εύχομαι και στους δυο καλή συνέχεια στο δικό τους ταξίδι (και να τους θυμίσω ότι η υπομονή θεωρείται αρετή). Βέβαια, ένα ιδιαίτερο και μεγάλο ευχαριστώ θέλω να πω στην Μεταπτυχιακή (επίσης για λίγο ακόμα) φοιτήτρια Μυρτώ Πατρασκάκη, για έναν λόγο για τον οποίο μπορώ να ευχαριστήσω πολύ λίγους ανθρώπους: για την απύθμενη συμπαράστασή της, για την προτροπή της και την ενθάρρυνση που μου έδωσε να αντιμετωπίσω διάφορες δυσκολίες (αυτά μέχρι τώρα είναι καλά αλλά όχι μοναδικά) μα πάνω από όλα για την έμπνευση που μου εμφύσησε από τη στιγμή που πραγματικά την γνώρισα. Ένα ευχαριστώ και στα παιδιά με τα οπαία συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια και καθένα έχει μια θέση ....στις ευχαριστίες (γιατί στη συνείδησή μου έχουν ούτος ή άλλως): στη Μαρία Τζιόρτζιου, και στη Φωτεινή Καλούση (καλή σταδιοδρομία στο διδακτορικό σου και κουράγιο). Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Μεταπτυχιακό φοιτητή Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, για όλο το ζήλο που έδειξε κατά την ταυτόχρονη παρουσία μας στο εργαστήριο αλλά και για την αίσθηση του χιούμορ που τον χαρακτηρίζει (και που μοιράστηκε απλόχερα μαζί μου), στον Μεταπτυχιακό φοιτητή Συμεών Κούλα και στη Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αναστασία Τσαγκαράκου, για την φιλική σχέση που (παρ)αναπτύξαμε. Σε όλους τους προαναφερθέντες εύχομαι καλή σταδιοδρομία. Επίσης, ευχαριστώ την Κατερίνα Σιοτοπούλου, την Αγγελική Κομνηνού, την Ελένη Λιάκου, την Νάταλη Σωτηρίου, τον Λευτέρη Γαβριήλ, τη Δήμητρα Γεωργαντζά και τη Ζέτα Γιαννούλη για την αρμονική συνεργασία μας.

Τελειώνοντας κάπου εδώ, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου (ειλικρινά αυτά τα αυτονόητα που όλοι φανταζόμαστε είναι τα πιο μα πιο ουσιαστικά που υπάρχουν), για όλα όσα μου έχουν προσφέρει (και πιστέψτε με...είναι πολλά), την αδελφή μου (για όσα έχουμε μοιραστεί όλα αυτά τα χρόνια) και εσχάτως... την ανιψιά μου Ηλέκτρα.

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>4</b>
1.1 Πυρηνικοί Υποδοχείς .....	4
1.2 Υποδοχείς στεροειδών ορμονών και στεροειδές ορμόνες .....	6
1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων.....	8
1.3.1 Δομή του υποδοχέα των οιστρογόνων .....	8
1.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα των οιστρογόνων : ERα και ERβ.....	11
1.3.3 Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου του ERα.....	12
1.3.4 Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου του ERβ.....	14
1.4 Οιστρογόνα.....	15
1.5 Μηχανισμοί δράσης .....	18
1.5.1 Γενωμική δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων .....	18
1.5.1.1 Άμεση σύνδεση στο DNA-κλασσική γενωμική οδός .....	18
1.5.1.2 Έμμεση σύνδεση στο DNA – μη-κλασσική γενωμική οδός .....	20
1.5.1.3 Μεταγραφικοί συμπαράγοντες.....	23
1.5.1.4 Μη γενωμική δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων .....	25
1.5.1.5 Συνομιλία γενωμικών και μη γενωμικών δράσεων της E2.....	27
1.5.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα .....	29
1.5.2.1 Φωσφορυλίωση του ER.....	29
1.5.2.2 Ακετυλίωση του ER.....	30
1.5.2.3 Ουβικουιτινίωση του ER.....	30
1.5.2.4 Σουμοϋλίωση του ER .....	31
1.6 Μιτοχονδριακή δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων .....	31
1.6.1. Μιτοχόνδρια, μιτοχονδριακό DNA και μιτοχονδριακές λειτουργίες.....	31
1.6.2 Ρόλος των στεροειδών ορμονών στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής .....	33
1.6.3 Μιτοχονδριακή εντόπιση των υποδοχέων των οιστρογόνων .....	37
1.6.4 Πιθανοί μηχανισμοί εισόδου των υποδοχέων των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια.....	37
1.6.5 Δράσεις των οιστρογόνων στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, της απόπτωσης και αντιοξειδωτικές δράσεις οιστρογόνων.....	38
1.7 Ρύθμιση της φυσιολογίας του οργανισμού από τους υποδοχείς οιστρογόνων .....	41
1.7.1 Η νευροπροστατευτική δράση της E2 .....	44
1.7.3 Κύριοι νευροπροστατευτικοί οδοί σηματοδότησης .....	47
1.7.4 Οι υποδοχείς των οιστρογόνων στο καρκίνο του μαστού .....	51
1.7.5 ERα στον καρκίνο του μαστού .....	52
1.7.6 ERβ και καρκίνος του μαστού .....	53
1.8 Μόρια με οιστρογονική δράση .....	54
1.8.1 Φυτοοιστρογόνα.....	54
1.8.2 Ξενοοιστρογόνα .....	54

1.8.3 Μεταλλοιστρογόνα .....	55
1.8.4 Μηχανισμοί δράσης μεταλλοιστρογόνων .....	56
1.8.5 Άλατα αργιλίου – Υδροξυ-χλωριούχο αργίλιο (Aluminum Chlorohydrate, ACH) .....	58
1.8.6 Πηγές έκθεσης στο αργίλιο .....	58
1.8.7 Χημικές ιδιότητες αργιλίου .....	59
1.8.8 Απορρόφηση αργιλίου .....	59
1.8.9 Κατανομή αργιλίου .....	60
1.8.10 Απομάκρυνση αργιλίου .....	61
1.8.11 Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το αργίλιο .....	62
<b>1.9 Σκοπός .....</b>	<b>67</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>69</b>
<b>2.1 Καρκινικές σειρές – καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων .....</b>	<b>74</b>
<b>2.2 Δημιουργία εμβρυϊκού βόειου ορού απενεργοποιημένου με ζωάνθρακα (Charcoal inactivated serum - cis) .....</b>	<b>74</b>
<b>2.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (Transfection) .....</b>	<b>75</b>
2.2.1 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου παρουσία φωσφορικών ιόντων .....	76
2.2.2. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση κατιονικών λιποσωμάτων .....	77
<b>2.4 Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων .....</b>	<b>78</b>
<b>2.5 Μέθοδος ΧΤΤ .....</b>	<b>79</b>
<b>2.6 Απομόνωση εμπλουτισμένων μιτοχονδριακών κλασμάτων .....</b>	<b>80</b>
<b>2.7 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της Real Time PCR .....</b>	<b>82</b>
<b>2.8 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστηριότητας λουσιφεράσης / β-γαλακτοσιδάσης .....</b>	<b>85</b>
<b>2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE) .....</b>	<b>87</b>
2.9.1 Σύλλογή και λύση ευκαρυωτικών κυττάρων – ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών .....	87
2.9.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE) .....	89
<b>2.10 Ανασοαποτύπωση κατά Western blot .....</b>	<b>90</b>
2.10.1 Μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης .....	90
2.10.2 Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων .....	91
2.10.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών .....	91
<b>2.11 Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry – ICC) .....</b>	<b>92</b>
<b>2.12 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation - IP) .....</b>	<b>94</b>
<b>2.13 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation – ChIP) .....</b>	<b>97</b>

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....101**

#### **3.1 Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων σε καρκινικές σειρές κυττάρων μαστού και νευροβλαστώματος..... 101**

#### **3.2 Μελέτη της εμπλοκής αλάτων αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση κυττάρων μαστού και νευρικών κυττάρων ..... 102**

##### **3.2.A Μελέτη της οιστρογονικής δράσης του ACH σε καρκινικά κύτταρα του μαστού ..... 102**

##### **3.2.A.1 Μελέτη της επίδρασης του ACH στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού ..... 102**

##### **3.2.A.2 Διερεύνηση της επίδρασης του ACH στην μεταγραφική ενεργότητα των υποδοχέων οιστρογόνων ..... 103**

##### **3.2.A.3 Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα ..... 106**

##### **3.2.A.4 Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων-στόχων των ERs..... 108**

##### **3.2.A.5 Επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA του ERα και γονιδίων στόχων των υποδοχέων οιστρογόνων ..... 110**

##### **3.2.A.6 Επίδραση του ACH στην υποκυτταρική εντόπιση του ERα και του ERβ σε καρκινικά κύτταρα μαστού ..... 112**

##### **3.2.A.7 Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μιτοχονδριακών μορίων που υπόκεινται σε ρύθμιση από την οιστρογονική σηματοδότηση..... 114**

##### **3.2.A.8 Έλεγχος της επίδρασης του ACH στους μηχανισμούς αποικοδόμησης του ERα..... 116**

##### **3.2.B Διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης του ACH σε νευρικά κύτταρα ..... 118**

##### **3.2.B.1 Έλεγχος της επίδρασης του ACH στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των ERs σε κύτταρα νευροβλαστώματος ..... 118**

##### **3.2.B.2 Επίδραση του ACH στην έκφραση ρυθμιστικών μορίων της απόπτωσης σε κύτταρα νευροβλαστώματος-Συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του ERβ ..... 120**

##### **3.2.B.3 Επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA των ERα και ERβ ..... 122**

##### **3.2.B.4 Επίδραση του ACH στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ERβ σε νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y ..... 123**

##### **3.2.B.5 Επίδραση του ACH σε επίπεδα μιτοχονδριακών μορίων που σχετίζονται με οιστρογονική σηματοδότηση ..... 125**

#### **3.3 Διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού ERβ στα νευρικά κύτταρα ..... 127**

##### **3.3.1 Κατασκευή σταθερά μετασηματισμένων νευροβλαστωματικών κυττάρων εμπλουτισμένων ως προς την έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων βήτα με μιτοχονδριακή στόχευση ..... 127**

##### **3.3.2 Αλληλεπίδραση του μιτοχονδριακού ERβ με στοιχεία του μιτοχονδριακού DNA στα νευρικά κύτταρα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ..... 132**

##### **3.3.3 Έλεγχος της μεταγραφής μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων νευρικών κυττάρων από τον μιτοχονδριακό ERβ..... 134**

##### **3.3.4 Χαρακτηρισμός μορίων που αλληλεπιδρούν με τον μιτοχονδριακό ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον ..... 136**

### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....141**

### **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....157**

.....αφιερωμένο στη Κάρα

# Περίληψη

Τα οιστρογόνα, ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών και ρυθμίζουν πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως το μεταβολισμό, την ανάπτυξη και αναπαραγωγή, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς των οιστρογόνων (υπότυποι άλφα και βήτα, ERα και ERβ και αντίστοιχες ισομορφές αυτών), οι οποίοι εντοπίζονται σε διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια όπως στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, στις μεμβράνες και στα μιτοχόνδρια. Τα οιστρογόνα μέσω γενωμικών και μη γενωμικών μηχανισμών δράσης, ελέγχουν τη λειτουργία και φυσιολογία πολλών συστημάτων στον οργανισμό όπως το νευρικό, το καρδιαγγειακό και το σκελετικό σύστημα, και εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος του μαστού και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Δεδομένης μάλιστα της παρεμβολής πληθώρας ενδοκρινικών διαταρακτών στην οιστρογονική σηματοδότηση, η κατανόηση και η αποσαφήνιση των βιοχημικών μηχανισμών δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων καθώς και η παρέκκλιση αυτών από τη φυσιολογική τους λειτουργία είναι ύψιστης σημασίας για την αντιμετώπιση οιστρογόνο εξαρτώμενων παθολογικών καταστάσεων. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής διερευνήθηκε ο ρόλος του μιτοχονδριακού ERβ και ελέγχθηκε η πιθανή οιστρογονική δράση αλάτων αργιλίου, και συγκεκριμένα του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου σε καρκινικά κύτταρα μαστού και σε νευροβλαστωματικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα των μελετών υποδεικνύουν την οιστρογονική δράση του αργιλίου, η οποία μεσολαβεί μέσω του ERα, καθώς παρουσία αργιλίου αυξάνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα, σε ERα θετικά κύτταρα μαστού του ανθρώπου, αυξάνοντας παράλληλα τόσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα, όσο και τα επίπεδα mRNA γονιδίων-στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης. Δράσεις οι οποίες αναιρούνται παρουσία του ανταγωνιστή οιστρογόνων ICI 182 780 (ICI) και δεν παρατηρούνται σε ERα αρνητικά κύτταρα μαστού. Πειραματικά δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι ο μηχανισμός, μέσω του οποίου το αργίλιο επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα είναι, μεταξύ άλλων, η πιθανή παρεμβολή του σε μηχανισμούς αποικοδόμησης του υποδοχέα, οι οποίοι ενεργοποιούνται κατόπιν φωσφορυλίωσής τους στο κατάλοιπο της Ser118. Αύξηση των επιπέδων ERα, παρουσία ιόντων αργιλίου, πιθανόν να συντελεί στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη καρκινογένεσης σε κύτταρα μαστού. Επίσης, μέσω της αρνητικής ρύθμισης που ασκεί ο ERα στην έκφραση και δράση του ERβ πιθανόν να επηρεάζονται προστατευτικές δράσεις, οι οποίες επιτελούνται μέσω του ERβ, σε ERβ θετικά κύτταρα. Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή, παρουσία ιόντων αργιλίου μειώνονται τόσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα, όσο και τα επίπεδα mRNA του ERβ σε κύτταρα νευροβλαστώματος. Η μείωση αυτή συνοδεύεται από ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, και πιθανόν να σχετίζεται με τον παρατηρούμενο νευροεκφυλισμό, υπό συνθήκες συσσώρευσης ιόντων αργιλίου. Η παρουσία αλάτων αργιλίου



αυξάνει επίσης την περιπυρηνική και πιθανώς μιτοχονδριακή εντόπιση των υποδοχέων, επηρεάζοντας έτσι τις μιτοχονδριακές λειτουργίες. Οι μελέτες μας σχετικά με τον ρόλο του μιτοχονδριακού ERβ σε νευροβλαστωματικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERβ με μιτοχονδριακή στόχευση (mtERβ) ανέδειξαν την ικανότητα του mtERβ να επάγει τη μεταγραφή μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, μέσω της αλληλεπίδρασης του mtERβ τόσο με οιστρογόνο-εξαρτώμενα στοιχεία (EREs) όσο και με στοιχεία απόκρισης στον παράγοντα CREB (CREs), τα οποία βρίσκονται στη D-loop του μιτοχονδριακού DNA. Επίσης, ο χαρακτηρισμός πρωτεϊνών θερμικού σοκ και συστατικών του συμπλόκου V, ως αλληλεπιδρώντα με τον mtERβ μόρια, συντελεί στην κατανόηση των μηχανισμών εισόδου και δράσης του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια.

Λέξεις κλειδιά: υποδοχείς οιστρογόνων, αργίλιο, μιτοχόνδρια, καρκίνος, νευρικό σύστημα

## Summary

Estrogens belong to the family of steroid hormones and regulate a variety of biological processes such as metabolism, cell growth and reproduction, via binding to estrogen receptors (alpha and beta isoforms, ERα and ERβ), which are localized in various subcellular organelles such as nucleus, cytoplasm, membranes and mitochondria. ERs control the function and the physiology of many systems such as the nervous, cardiovascular and skeletal system, via genomic and non-genomic mechanisms of action and are involved in the regulation of many pathological conditions such as breast cancer and neurodegenerative diseases. ERs can interfere with a variety of endocrine disruptors, affecting human physiology. Thus, it is very important to elucidate and characterize the biochemical and molecular mechanisms of the interaction between ERs and endocrine disruptors. In this context, the role of the mitochondrial ERβ and the potential estrogenic action of aluminum salts, in particular aluminum chlorochloride in breast cancer cells and neuroblastoma cells were investigated, in this study. The results of our studies reveal aluminum estrogenicity, which is mediated mainly by ERα. In the presence of aluminum the protein levels as well as mRNA levels of ERα are increased in human ERα-positive human breast cancer cells. This effect is accompanied by increase in the mRNA levels of several estrogen target genes and elimination of this action in the presence of the estrogen antagonist ICI182 780(ICI). In addition these actions are not observed in ERα-negative breast cancer cells. Our experimental observations also suggest that the mechanism by which aluminum affects the protein levels of ERα, is among others, through its possible involvement in estrogen receptor's degradation mechanism, affecting ERα phosphorylation at the residue Ser118. Increase in ERα protein levels, in the presence of aluminum ions, may contribute to development and progress of breast cancer. Also, through

the ER $\alpha$ -dependent regulation of ER $\beta$  expression and action, aluminum may affect the ER $\beta$  protective effects. In agreement with this hypothesis, in the presence of aluminum ions, both protein and mRNA levels of ER $\beta$  are reduced in neuroblastoma cells. This reduction is accompanied by activation of apoptosis, and possibly it is associated with the observed neurodegeneration, upon aluminum salts accumulation. Aluminum salts also induce perinuclear and possibly mitochondrial localization of estrogen receptors, affecting mitochondrial functions. Our studies on the characterization of the role of mitochondrial ER $\beta$  in neuroblastoma cells reveal the ability of mitochondrial targeted ER $\beta$  (mtER $\beta$ ) to induce mitochondrial transcription activation via the interaction of mtER $\beta$  with both the estrogen responsive elements (EREs) and cAMP responsive elements (CREs), located in the D-loop of mitochondrial DNA. Also, the characterization of heat shock proteins and components of the complex V that as mtER $\beta$  interacting proteins contribute to the elucidation of the mechanism(s) of entrance and action of the mitochondrial estrogen receptor.

Keywords: estrogen receptors, aluminum, mitochondria, cancer, nervous system

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Πυρηνικοί Υποδοχείς

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (nuclear receptors, NRs) είναι μια από τις μεγαλύτερες τάξεις μεταγραφικών παραγόντων στους ζωικούς οργανισμούς, ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες, όπως τον μεταβολισμό, το ισοζύγιο του άλατος και κατ' επέκταση τη διατήρηση του ισοζυγίου του ύδατος, την οξεοβασική ισορροπία και την ανάπτυξη, την ωρίμανση και την ομαλή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Οι πυρηνικοί υποδοχείς λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεσή τους με τον κατάλληλο προσδέτη, και έτσι αποτελούν ένα σύνδεσμο μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες και των μεταγραφικών αποκρίσεων (Robinson-Rechavi et al., 2003). Οι προσδέτες τους μπορεί να είναι στεροειδείς ορμόνες, όπως τα γλυκοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, καθώς και άλλα λιποδιαλυτά μόρια, όπως το ρετινοϊκό οξύ, οι οξυστερόλες και οι θυρεοειδείς ορμόνες (Robinson-Rechavi et al., 2003). Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, τα συγκεκριμένα μόρια μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες και να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου συνδέονται απευθείας με τους πυρηνικούς υποδοχείς. Οι πυρηνικοί υποδοχείς εντοπίζονται συνήθως ως μονομερή στην ανενεργή τους κατάσταση μέσα στο κύτταρο, και η σύνδεσή τους με τον προσδέτη οδηγεί στον διμερισμό τους και στη συνέχεια στην πρόσδεσή τους σε *cis* ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, τα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (HRE: Hormone Response Elements- ορμονο-ανταποκρινόμενα στοιχεία), ρυθμίζοντας τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων στόχων (Sever & Glass, 2013) και ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση. Λόγω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν πολλούς μηχανισμούς ελέγχου της φυσιολογίας του οργανισμού, μια πιθανή δυσλειτουργία της σηματοδότησής τους μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως μεταβολικές διαταραχές, διαταραχή στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Επίσης, ο έλεγχος της εκλεκτικής ενεργοποίησής τους από κατάλληλους προσδέτες, πέραν των φυσικών, τους καθιστά πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (Germain et al., 2006).

Με βάση τους μηχανισμούς εκδήλωσης της μεταγραφικής τους ενεργότητας, οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να καταταγούν σε 4 βασικές κατηγορίες (Sever & Glass, 2013) :

- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου I: Μετά τη σύνδεσή τους με τον προσδέτη, οι υποδοχείς τύπου I μεταφέρονται στον πυρήνα όπου σχηματίζουν ομοδιμερή, συνδέονται, με ειδικές περιοχές του DNA, που φέρουν ανάστροφες επαναλήψεις, και ρυθμίζουν άμεσα τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου-στόχου. Σε αυτή την κατηγορία υπάγονται οι υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs), οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (GRs), της προγεστερόνης, των αλατοκορτικοειδών και των ανδρογόνων.
- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου II: Ανεξαρτήτως της πρόσδεσης με τους φυσικούς προσδέτες, διατηρούνται στον πυρήνα και συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ως ετεροδιμερή, προσδεδεμένοι σε συγκεκριμένες επαναλήψεις του DNA. Σε αυτή τη μορφή είναι προσδεδεμένοι με συγκαταστολείς και αποσιωπούν την έκφραση γονιδίων-στόχων. Η δέσμευση του φυσικού προσδέτη επάγει την απελευθέρωση των συγκαταστολέων, τη στρατολόγηση συν-ενεργοποιητών και την εκκίνηση της γονιδιακής έκφρασης. Σε αυτή τη κατηγορία συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων, οι PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors) και οι υποδοχείς της βιταμίνης D (VDRs).
- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου III: Προσομοιάζουν τους υποδοχείς του τύπου I με τη διαφορά ότι προσδένονται σε επαναλήψεις και όχι ανάστροφες.
- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου IV: Προσδένονται στις αλληλουχίες-στόχους ως μονομερή. Συχνά αναφέρονται και ως "ορφανοί υποδοχείς" (orphan receptors).

Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν μια κοινή οργάνωση, αποτελούμενοι από 6 κοινές συντηρημένες επικράτειες. Το αμινοτελικό άκρο (επικράτεια A/B) παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα και περιλαμβάνει τουλάχιστον μια συνεχώς ενεργή περιοχή trans-ενεργοποίησης (AF-1) και αρκετές αυτόνομες περιοχές trans-ενεργοποίησης (AD). Το μήκος των επικρατειών A/B κυμαίνεται από 50 έως πάνω από 500 αμινοξέα, ενώ η τρισδιάστατη δομή τους δεν είναι ακόμη γνωστή. Η πιο συντηρημένη περιοχή είναι η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD, επικράτεια C), η οποία είναι υπεύθυνη για τη στόχευση των υποδοχέων σε περιοχές DNA υψηλής εξειδίκευσης, που είναι γνωστές ως "στοιχεία απόκρισης" (response elements, REs). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA περιλαμβάνει το P-box, ένα μικρό μοτίβο, με νουκλεοτιδική αλληλουχία "AGGTCA", υπεύθυνο για την εξειδικευμένη πρόσδεση των υποδοχέων στο DNA, το οποίο εμπλέκεται και στο διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων. Ο διμερισμός περιλαμβάνει τόσο ομο-διμερή όσο και ετερο-διμερή στοιχεία. Έχει προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή της επικράτειας πρόσδεσης στο DNA πολλών πυρηνικών υποδοχέων και φαίνεται να περιλαμβάνει δύο υψηλά συντηρημένα μοτίβα ψευδαργύρου (C-X2-C-

X13-C-X2-C και CX5-C-X9-C-X2-C), με 4 κυστεΐνες κάθε μία από τις οποίες δεσμεύεται με το ιόν ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) (Robinson-Rechavi et al., 2003). Η μεγαλύτερη επικράτεια είναι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (ligand binding domain, LBD, επικράτεια E), η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα και αναγνωρίζει ορμονικούς ή μη ορμονικούς προσδέτες. Η δευτεροταγής δομή της είναι περισσότερο συντηρημένη από την πρωτοταγή και περιλαμβάνει 12 α έλικες. Η επικράτεια E είναι υπεύθυνη για διάφορες λειτουργίες όπως η σύνδεση του προσδέτη, η trans-ενεργοποίηση της μεταγραφής (AF-2), ο ισχυρός διμερισμός των υποδοχέων και η πυρηνική τους στόχευση μέσω άλλης μιας αλληλουχίας NLS (nuclear localization signal) που εμπεριέχει (Robinson-Rechavi et al., 2003). Ανάμεσα στην επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και σύνδεσης του προσδέτη βρίσκεται μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή άρθρωσης (hinge region, επικράτεια D), που ποικίλει σε μήκος και δρα ως ευέλικτος σύνδεσμος μεταξύ των επικρατειών C και E και περιέχει μια δεύτερη αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης του υποδοχέα (nuclear localization signal, NLS), που πιθανόν αλληλεπικαλύπτεται με την επικράτεια C (DBD). Οι πυρηνικοί υποδοχείς πιθανόν να περιέχουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μετά την επικράτεια E, την επικράτεια F, που είναι αρκετά μεταβλητή και η δομή και η λειτουργία της οποίας είναι μέχρι στιγμής άγνωστη (Robinson-Rechavi et al., 2003).

## 1.2 Υποδοχείς στεροειδών ορμονών και στεροειδείς ορμόνες

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελούν την πρώτη τάξη των πυρηνικών υποδοχέων και περιλαμβάνουν τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptors, GR), τους υποδοχείς οιστρογόνων (estrogen receptors, ER), τους υποδοχείς ανδρογόνων (androgen receptors, AR), τους υποδοχείς προγεσταγόνων (progesterone receptors, PR) και τους υποδοχείς μεταλλοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptors, MR) (Hidalgo et al., 2014). Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες, που εντοπίζονται τόσο στο πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, ενώ κάποιοι έχουν εντοπιστεί και στην πλασματική μεμβράνη. Όπως είναι αναμενόμενο η δευτεροταγής τους δομή παρουσιάζει ομολογία με αυτή των υποδοχέων της ίδιας οικογενείας (Hidalgo, 2014). Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες: τους υποδοχείς των οιστρογόνων και τους υποδοχείς των 3-κετοστεροειδών (υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, αλατοκορτικοειδών, προγεστερόνης και ανδρογόνων).

Απουσία των στεροειδών ορμονών, οι στεροειδείς υποδοχείς παραμένουν ως ανενεργό σύμπλοκο με ανοσοφιλίνες και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp90, Hsp70, Hsp56) οι οποίες βοηθούν στην αποφυγή λανθασμένων μορφών αναδίπλωσης των υποδοχέων (Fiocchetti, et al., 2012). Με την είσοδο, μέσω διάχυσης, της λιπόφιλης στεροειδούς ορμόνης στο κύτταρο, και με την πρόσδεσή της στον υποδοχέα, ο τελευταίος αποδεσμεύεται από τις Hsp λόγω αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωσή του. Η απελευθέρωση από τις Hsp, αφήνει ελεύθερη την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού καθώς και την DBD (Sever & Glass, 2013). Ακολουθεί διμερισμός του υποδοχέα και μετατόπιση του διμερούς αυτού στον πυρήνα. Εκεί, με την πρόσδεσή του στα HREs ο υποδοχέας των στεροειδών ορμονών ασκεί τη γενωμική του δράση, καθώς η στρατολόγηση επιπλέον ρυθμιστικών παραγόντων με ικανότητα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, του επιτρέπουν να ρυθμίσει άμεσα τη μεταγραφική ενεργότητα των εκάστοτε γονιδίων-στόχων του (Sever & Glass, 2013).

Επίσης, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των στεροειδών υποδοχέων, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς, είναι ότι διαθέτουν την ικανότητα πρόκλησης και μη γενωμικής δράσης (εκτός της κλασικής γενωμικής τους δράσης). Η μη γενωμική αυτή δράση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και καταρράκτη αντιδράσεων, που οδηγούν σε άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις (Gupte et al., 2015).

Επίσης, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, υφίστανται προσδετο-επαγόμενη καταστολή. Αυτή η ρύθμιση, αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό, που περιορίζει την ορμονική δράση στους ιστούς στόχους (Gupte et al., 2015).

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλα μόρια που προέρχονται από τη χοληστερόλη και συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή και ανδρογόνα επινεφριδίων), στους όρχεις (ανδρογόνα όρχεων και οιστρογόνα), καθώς και στις ωοθήκες και στον πλακούντα (οιστρογόνα και προγεσταγόνα) (Beato, 1989). Οι στεροειδείς ορμόνες φτάνουν τους στόχους τους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, όπου συνδέονται με πρωτεΐνες μεταφορείς (όπως η γλοβουλίνη πρόσδεσης των φυλετικών ορμονών και η γλοβουλίνη πρόσδεσης των κορτικοειδών) και λόγω της λιπόφιλης φύσης τους διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω απλής διάχυσης. Μέσα στα κύτταρα στόχους οι στεροειδείς ορμόνες συνδέονται με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και τους ενεργοποιούν (Beato, 1989). Η ανακύκλωση και ο καταβολισμός των στεροειδών ορμονών συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους περιφερικούς ιστούς ή στους ιστούς δράσης της κάθε ορμόνης.

Family	Receptor	Ligand(s)
Steroid hormone rec.	estrogen rec. (ER) glucocorticoid rec. (GR) mineralocorticoid rec. (MR) androgen rec. (AR) progesterone rec. (PR)	estradiol cortisol aldosterone testosterone progesterone
Thyroid hormone rec.	thyroid hormone rec. (TR)	T3
Retinoid rec.	retinoic acid rec. (RAR) retinoic acid X rec. (RXR)	all-trans-retinoic acid 9-cis-retinoic acid
Vitamin D rec.	vitamin D rec (VDR)	1,25-hydroxy-cholecalciferol
Lipid sensors	liver X rec. (LXR) farnesoid X rec. (FXR)	oxysterols bile acids
PPAR	peroxisome proliferator activated rec.	fatty acids, eicosanoids (e.g. LTs, PGs)

**Εικόνα 1.** Η υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων : στην πρώτη στήλη αναγράφονται οι οικογένειες των πυρηνικών υποδοχέων, στην δεύτερη στήλη αναγράφονται τα μέλη της κάθε οικογένειας και στην τρίτη στήλη αναγράφονται οι προσδέτες του κάθε υποδοχέα (Berki et al., 2011).

## 1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων

### 1.3.1 Δομή του υποδοχέα των οιστρογόνων

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα ήταν γνωστή η ύπαρξη ενός μόνο υποδοχέα οιστρογόνων (estrogen receptor-ER) που κωδικοποιούνται από το αντίστοιχο γονίδιο του ERα (Planey et al., 2014). Η ύπαρξη του ERα αποδείχθηκε από τον Elwood Jensen το 1958 και το αντίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε το 1985. Στα μέσα της δεκαετίας του '90 (1996) κλωνοποιήθηκε από τον προστάτη και την ωοθήκη του αρουραίου ο ERβ, προσθέτοντας νέα γνώση στην κατανόηση των μηχανισμών σηματοδότησης των οιστρογόνων (Jia et al., 2015). Αργότερα, περιγράφηκε και η ύπαρξη μιας ακόμα μορφής του υποδοχέα, η οποία παρουσιάζει μεμβρανική εντόπιση και αλληλεπιδρά με G πρωτεΐνες (G protein coupled E2 receptor) (Gupte et al., 2015).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους ERα και ERβ εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, 6q25.1 και 14q23.2, αντίστοιχα. Ο ERα εκφράζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς (μήτρα, ωοθήκη), καθώς και στο μαστό, τους νεφρούς, τα οστά, το λευκό λιπώδες ιστό και στο ήπαρ, ενώ ο ERβ εντοπίζεται στις ωοθήκες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο καρδιαγγειακό σύστημα, στον πνεύμονα, στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, στον

προστάτη, στο παχύ έντερο, στο νεφρό και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ως μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών πυρηνικών υποδοχέων, οι ERs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά επίσης στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Psarra & Sekeris, 2008 ;Jia et al., 2015).

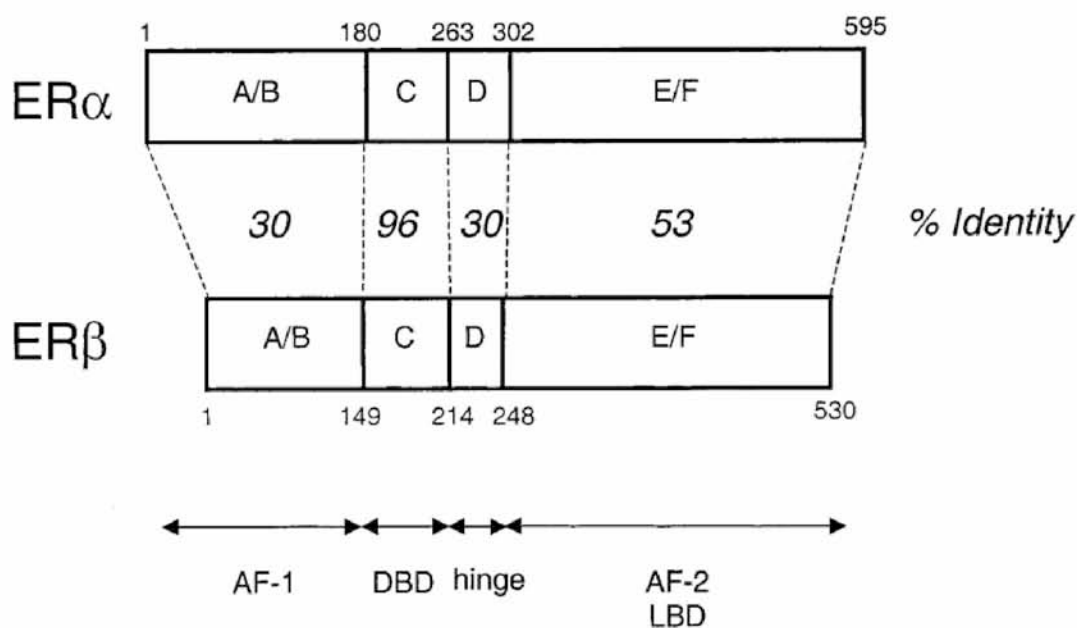
Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, έτσι και οι ERs έχουν μια μοναδική δομή και αποτελούνται από τρεις κύριες δομικές και λειτουργικές περιοχές (Beato et al., 1995). Αυτές είναι : η N-τελική περιοχή (N-terminal domain – NTD), η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain – DBD) και η περιοχή του προσδέτη (ligand binding domain – LBD). Η μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα επιτυγχάνεται με τη συνεργική δράση δυο ρυθμιστικών περιοχών των υποδοχέων, AF-1 (activation function-1) και AF-2 (activation function-2), οι οποίες εντοπίζονται εντός της NTD και της LBD, αντίστοιχα. Η ενεργότητα των AFs εξαρτάται από το είδος του υποκινητή αλλά και από το είδος του κυττάρου/ιστού (Tora et al., 1989). Η λειτουργικότητα της AF-1 είναι ανεξάρτητη από την πρόσδεση του υποδοχέα με ορμόνες, ενώ η λειτουργικότητα της AF-2 είναι προσδετο-εξαρτώμενη (Berry et al., 1990).

Όσον αφορά την ομολογία των αλληλουχιών, ο ERβ παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τον ERα στην LBD και στην DBD, όμως η NTD του ERβ είναι κατά πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη του ERα, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα πολύ μικρή ομολογία (Kuiper et al., 1996). Επιπλέον των περιοχών NTD, LBD και DBD, οι ERs αποτελούνται και από την περιοχή άρθρωσης (hinge domain) και από την περιοχή F. Η περιοχή άρθρωσης περιέχει μία σηματοδοτική αμινοξική αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal) και στην ουσία είναι μια ευέλικτη περιοχή σύνδεσης μεταξύ της LBD και της DBD. Η περιοχή F αποτελείται από 42 αμινοξέα, εντοπίζεται στην C-τελική περιοχή της LBD και έχει την ικανότητα ελεγχόμενης ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων με ιστοειδικό, προσδετο-ειδικό και υποκινητο-ειδικό τρόπο (J. Yang, et al., 2008). Οι τρισδιάστατες δομές (3D structure) των ανεξάρτητα εκφρασμένων LBD και DBD έχουν επιλυθεί (Pike et al., 1999), ενώ αντίστοιχα, δεν υπάρχουν 3D δομές για την NTD των ERs. Η DBD των ισομορφών ERα και ERβ είναι υπεύθυνη για τη πρόσδεση των ERs στις προσδετο-εξαρτώμενες αλληλουχίες EREs, οι οποίες αποτελούνται από μια παλινδρομική αλληλουχία έξι νουκλεοτιδίων (5'-AGGTCAnnnnTGACCT-3'). Η 3D δομή του ERα έδειξε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ERE-DBD και ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο των EREs στο διμερισμό του υποδοχέα, μέσω των αλληλουχιών των περιοχών P box και D box που βρίσκονται στην περιοχή του δακτυλίου ψευδαργύρου (Schwabe et al., 1993). Η LBD των ERs αποτελείται από 12 έλικες, εμπεριέχει μια θέση -"τσέπη" δέσμευσης της ορμόνης και είναι υπεύθυνη κυρίως για λειτουργίες που επάγονται μετά τη δέσμευση του προσδέτη, όπως τη σύνδεση συμπαραγόντων στην AF-2 περιοχή και το διμερισμό του υποδοχέα (Kong et al., 2005). Η κρυσταλλική δομή του



συμπλόκου της 17β-οιστραδιόλης (E2) με την LBD του ERα έδειξε ότι σε μια συμπαγή ελλειψοειδή κοιλότητα (LBD), η E2 περιβάλλεται από ένα πολύ υδρόφοβο περιβάλλον (Brzozowski et al., 1997). Η εξειδίκευση της δράσης του εκάστοτε προσδέτη σε σχέση με τον ERα και τον ERβ μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά κατάλοιπα που υπάρχουν στην εξωτερική πλευρά της θέσης πρόσδεσης της ορμόνης (Anstead et al., 1997).

Αντίθετα, δεν γνωρίζουμε επαρκείς πληροφορίες όσον αφορά την NTD των ERs. Προκαταρκτικές δομικές αναλύσεις έδειξαν ότι η NTDs τόσο του ERα όσο και του ERβ μεταβάλλονται ανάλογα με το μέσο διαλυτοποίησης (Warnmark et al., 2001). Επίσης, η σύνδεση του ERα με την προσδένουσα πρωτεΐνη στα TATA box (TATA box binding protein – TBP) άλλαξε τη δομή του. Αντίθετα, η TBP απέτυχε να προσδεθεί στην NTD του ERβ κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Αυτές λοιπόν οι διαφορές στη σύνδεση της TBP με την NTD των ERα και ERβ, αντίστοιχα, υποστηρίζουν ένα μοντέλο, στο οποίο οι δύο ισομορφές του υποδοχέα διαφοροποιούνται ως προς το είδος των TBP πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν (Kumar & Thompson, 2003). Αυτό το μοντέλο έρχεται σε συμφωνία με τις αναφορές περί λειτουργικών διαφορών μεταξύ της NTD του ERα και της NTD του ERβ, που δείχνουν ότι η περιοχή AF-1 του ERα μπορεί να λειτουργεί με αυτόνομο τρόπο, ενώ η περιοχή AF-1 του ERβ δεν μπορεί (Nilsson & Gustafsson, 2011; Warnmark et al., 2001). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι, γενικότερα ο ERβ παρουσιάζει ασθενέστερη μεταγραφική ενεργότητα σε σύγκριση με τον ERα, και αυτή η διαφορά φαίνεται να είναι ιστοειδική και να εξαρτάται από το είδος του υποκινητή (Nilsson & Gustafsson, 2011).

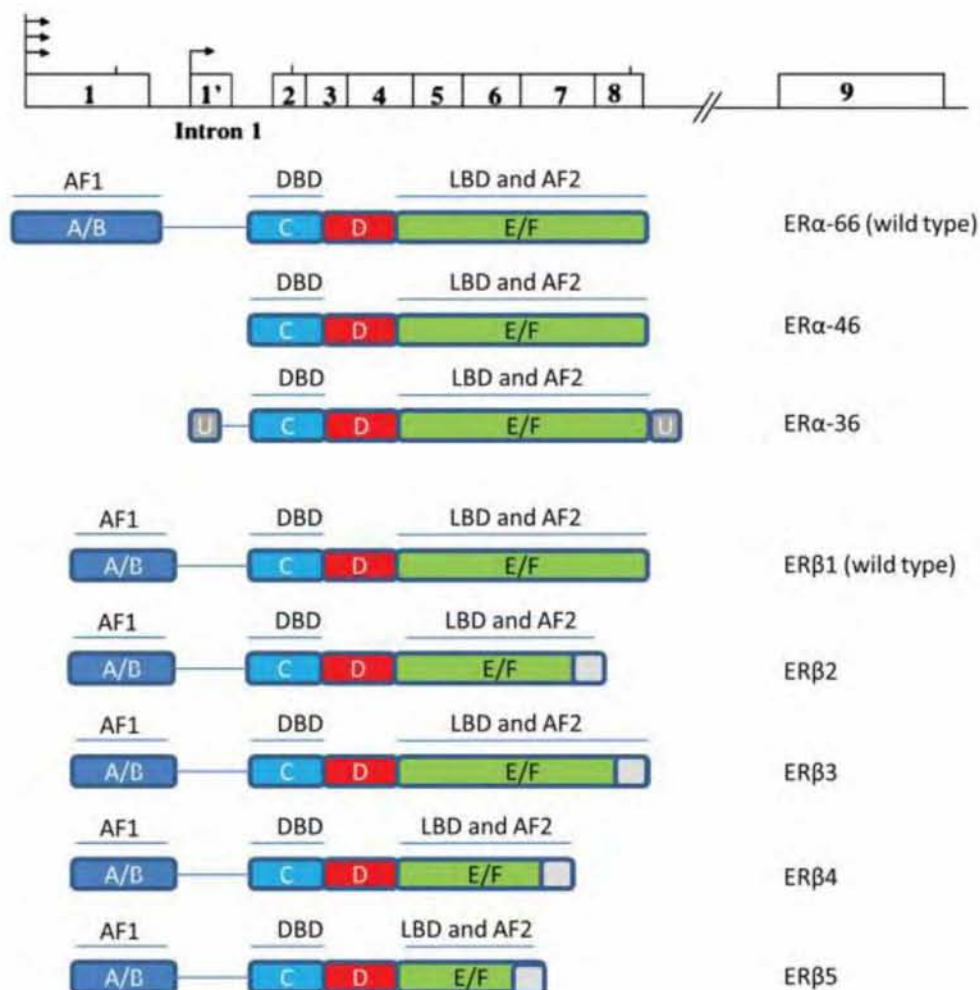


**Εικόνα 2.** Απεικόνιση των περιοχών και της ομολογίας της αλληλουχίας των ανθρώπινων ERα και ERβ. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τον ανθρώπινο ERα και ERβ και χωρίζονται στις δομικές τους

περιοχές (Α έως F). Οι θέσεις (αρίθμηση) των αμινοξέων υποδεικνύουν και τα όρια της κάθε περιοχής. Οι λειτουργικές περιοχές απεικονίζονται στο κάτω μέρος. Το ποσοστό της αμινοξικής ομολογίας μεταξύ των ανθρώπινων ERα και ERβ αναγράφεται για τη κάθε περιοχή (Dutertre & Smith, 2000).

### **1.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα των οιστρογόνων : ERα και ERβ**

Οι πρωτεΐνες ERα και ERβ πλήρους μήκους είναι περίπου 66 KDa και 59 kDa, αντίστοιχα, αν και, λόγω εναλλακτικού ματίσματος, και οι δυο υποδοχείς μπορούν να σχηματίσουν διαφορετικές ισομορφές (Ascenzi et al., 2006). Το γονίδιο του ERα έχει αποδειχθεί ότι κωδικοποιεί πάνω από 20 προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος στον καρκίνο του μαστού αλλά και σε άλλους καρκίνους, τρία εκ των οποίων έχουν αποδεδειγμένα λειτουργικό ρόλο, ενώ αντίστοιχα πέντε εναλλακτικές μορφές του ERβ έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο (Lewandowski et al., 2002). Η λειτουργία και η φυσιολογική σημασία όλων των ισομορφών δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως, αλλά μερικές ισομορφές είναι ισχυροί ρυθμιστές των σηματοδοτικών μονοπατιών των ERs σε φυσιολογικούς ιστούς.



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων ισομορφών και των αντίστοιχων επικρατειών των υποδοχέων των οιστρογόνων. Στο σχήμα απεικονίζονται μόνο εξώνια, με εξαίρεση το ιντρόνιο μεταξύ των περιοχών A / B και C, όπου έχει αναφερθεί μια εναλλακτική θέση έναρξης της μεταγραφής. Το ιντρόνιο 8, καθώς και το 9 περιλαμβάνονται μόνο στην αλληλουχία του ERα36. Τα γκρι πλαίσια αντιπροσωπεύουν τις ειδικές-μοναδικές εναλλακτικές αλληλουχίες αμινοξέων της κάθε ισομορφής (Kampa et al. 2013).

### 1.3.3 Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου του ERα

Οι δυο εκτενέστερα μελετημένες ισομορφές του ERα είναι ο ERα36 και ο ERα46, οι οποίοι αναστέλλουν τις γενωμικές δράσεις του ERα πλήρους μήκους (ERα66).

Η ισομορφή ERα46 έχει ταυτοποιηθεί στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-7 (Penot et al., 2005), στην οποία συνεκφράζεται μαζί με τον πλήρες μήκους ERα66. Η

παρουσία του ERα46 έχει επίσης επιβεβαιωθεί σε οστεοβλάστες (Z. Wang et al., 2005) και ενδοθηλιακά κύτταρα (Figtree et al., 2003). Στην ισομορφία αυτή απουσιάζει το εξώνιο 1, το οποίο κωδικοποιεί το N-τελικό άκρο (A/B) του υποδοχέα, άρα η ισομορφία ERα46 στερείται μιας λειτουργικής AF-1 περιοχής. Σε αντίθεση με τον ERα πλήρους μήκους, ο ERα46 δεν μεσολαβεί στον οιστρογόνο-εξαρτώμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένα επίπεδα αυτής της ισομορφίας σχετίζονται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1. Ομοίως με τον ERβ, ο ERα46 είναι ένας ισχυρός, προσδετο-εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας λόγω της AF-2 περιοχής και ένας ισχυρός αναστολέας της AF-1 εξαρτώμενης μεταγραφής του ERα (Figtree et al., 2003). Με την αναστολή της μεταγραφικής ικανότητας του ERα66, η ισομορφία ERα46 αναστέλλει και την οιστρογόνο-εξαρτώμενη επαγωγή της μεταγραφής των c-fos και της κυκλίνης D1, μόρια τα οποία εμπλέκονται άμεσα στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Συνέκφραση της ισομορφίας ERα46 και του ERα66 στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών SaOS2 έχει ως αποτέλεσμα μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της E2 αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δράση, δηλαδή, παρόμοια με αυτή που παρατηρούμαι κατά την ταυτόχρονη συνέκφραση των ERα και ERβ (Sotoca et al., 2008).

Η δεύτερη ισομορφία, ERα36, υπολείπεται τόσο της περιοχής AF-1 όσο και της AF-2 σε σχέση με την ERα66. Ωστόσο, έχει λειτουργική την περιοχή DBD και μερικώς λειτουργικές τις θέσεις διμερισμού και την LBD (Wang et al., 2005). Η ERα36 εμπεριέχει ένα εξώνιο που κωδικοποιεί θέσεις μυριστουϊλίου και που την καθιστούν ικανή να αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μεταγραφή της ισομορφίας ERα36 ξεκινάει από έναν εσωτερικό υποκινητή, ο οποίος βρίσκεται στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου του ERα και η μοναδική C-τελική αλληλουχία, που αποτελείται από 27 αμινοξέα, κωδικοποιείται από ένα εξώνιο, το οποίο εντοπίζεται καθοδικά του εξωνίου 8 και αντικαθιστά τα τελευταία 138 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τα εξώνια 7 και 8 (Wang et al., 2005).

Αυτή η ισομορφία (ERα36), κλωνοποιήθηκε από cDNA βιβλιοθήκη του ανθρώπινου πλακούντα, υποδηλώνοντας έτσι την φυσιολογική έκφρασή της στον άνθρωπο. Δίχως τις λειτουργικές περιοχές AF-1 και AF-2 δεν έχει καμία μεταγραφική ενεργότητα, όμως αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της μεταγραφικής ενεργότητας των ERα και ERβ (Z. Wang et al., 2006). Εντοπίζεται δε κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και δρα εντελώς διαφορετικά από την ERα66 (Wang et al., 2006). Αν και υπολείπεται οποιασδήποτε μεταγραφικής ενεργότητας, παρόλα αυτά μπορεί να ενεργοποιήσει μη γενωμικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τη σηματοδότηση μέσω MAPK/ERK σε απόκριση στην E2 (Wang et al., 2006).

Η ισομορφία ERα80 ανιχνεύτηκε στην κυτταρική σειρά MCF-7:2A, η οποία αποτελεί έναν υποκλώνο της κυτταρικής σειράς MCF-7 και προέρχεται από μακρόχρονη ανάπτυξη των

κυττάρων απουσία E2 (Pinket al., 1996). Η ισομορφή ERα80 προέκυψε μετά από κωδικοποίηση των διπλασιασμένων εξωνίων 6 και 7, χωρίς όμως να διευκρινίζεται ο ρόλος της.

Αρκετά άλλα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (ERαΔΕ2, ERαΔΕ3, ERαΔΕ4, ERαΔΕ5, ERαΔΕ6, ERαΔΕ7) έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο και όλα προκύπτουν από την απαλοιφή ενός ή και περισσότερων εξωνίων και φαίνεται να ασκούν ανασταλτική δράση στον ERα (Poola et al., 2002).

### 1.3.4 Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου του ERβ

Η ύπαρξη διαφόρων ισομορφών του ERβ έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και σε πολλούς ιστούς, γεγονός το οποίο παρέχει ένα πιθανό μηχανισμό ιστοειδικής ρύθμισης στην απόκριση στην οιστρογονική σηματοδότηση (Leung et al., 2006). Έτσι, πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τη κατανομή συγκεκριμένων ισομορφών του ERα και του ERβ όταν αξιολογούμε τη δράση της E2 στους ιστούς, καθώς οι ισομορφές αυτές έχουν διαφορετική και πολλές φορές ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους και η διαφορετική τους κατανομή επηρεάζει σημαντικά τη βιολογική απόκριση των ιστών στην ορμόνη.

Έχουν περιγραφεί ισομορφές του ERβ, οι οποίες διαφέρουν στην C-τελική περιοχή και έχουν κλωνοποιηθεί από ανθρώπινη cDNA βιβλιοθήκη των όρχεων (Moore et al., 1998). Ακόμα και σήμερα, λίγα είναι κατανοητά και γνωστά όσον αφορά τη λειτουργική τους σημασία. Η πιο γνωστή ισομορφή του ERβ, της οποίας η λειτουργία είναι γνωστή, είναι η ισομορφή ERβ1, η οποία έχει πλήρες μήκος (όμοιο με του αγρίου τύπου ERβ) και λειτουργικές τις περιοχές LBD και AF-2. Οι ισομορφές ERβ2,4 και 5 έχουν μικρότερη την έλικα 11 (Helix 11) ενώ η πλήρους μήκους έλικα 12 συναντάται μόνο στις ισομορφές ERβ1 και 2. Στην ισομορφή ERβ2, η έλικα 12 έχει διαφορετικό προσανατολισμό από την αντίστοιχη έλικα της ισομορφής ERβ1 και αυτό οφείλεται στην σμίκρυνση της έλικας 11. Έτσι, έχει αναφερθεί ότι η εκτοπισμένη έλικα 12 της ERβ2 περιορίζει την πρόσβαση του προσδέτη στην θέση-"τσέπη" σύνδεσης της LBD. Αποτέλεσμα αυτών των δομικών αλλαγών στις ισομορφές ERβ2,4 και 5, αποτελεί η αδυναμία σχηματισμού ομοδιμερών και η έλλειψη μεταγραφικής ενεργότητας, αν και έχει βρεθεί ότι μπορούν να ετεροδιμερίζονται με την ERβ1 παρουσία E2 και να επάγουν την εξαρτώμενη από την περιοχή AF-2, μεταγραφική ενεργότητα του ετεροδιμερούς (Leung et al., 2006). Λίγα δεδομένα υπάρχουν σε σχέση με την αλληλεπίδραση των διαφόρων ισομορφών του ERβ με τον ERα, όμως η ERβ2 (γνωστή και ως ERβcx) έχει αποδειχθεί ότι

μειώνει τη πρόσδεση του ERα66 στο DNA και επίσης μειώνει και τη μεταγραφική ικανότητα του ERα, ομοίως όπως και η ERβ1 (Ogawa et al., 1998).

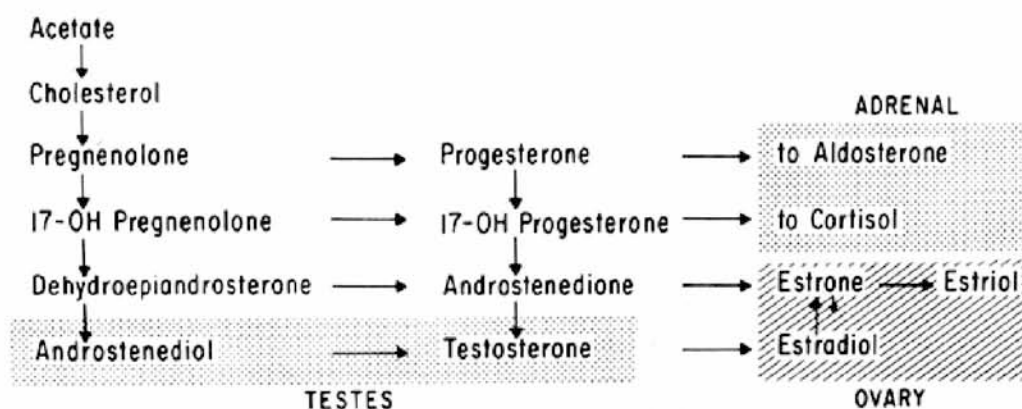
Επίσης, δυο άλλες ισομορφές του ERβ, στις οποίες απουσιάζουν ολόκληρα εξώνια, ανιχνεύτηκαν στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231, και πρόκειται για τις ERβΔ1,2,5 και ERβΔ1,2,5,6, οι οποίες είναι 35 και 28 kDa αντίστοιχα (Treeck et al., 2008). Και οι δυο πρωτεΐνες υπολείπονται της περιοχής AF-1 και εμφανίζουν ελλείψεις στις περιοχές LBD και DBD. Έτσι, αυτές οι δυο ισομορφές δεν έχουν ή έχουν μειωμένη προσδετο-εξαρτώμενη και μη-προσδετο-εξαρτώμενη ενεργότητα και η έκφρασή τους δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των καρκινικών σειρών, στις οποίες εκφράζονται.

## 1.4 Οιστρογόνα

Μέσω των υποδοχέων τους, με μηχανισμούς που θα περιγραφούν εκτενώς στην συνέχεια, τα οιστρογόνα (= *οἶστρος* + *γέννημι* δηλαδή ‘‘γεννούν την επιθυμία’’), είναι η κύρια φυλετική ορμόνη στις γυναίκες και έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση, τόσο του αναπαραγωγικού συστήματος όσο και των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών. Ωστόσο όμως, και στα δύο φύλα, ασκούν ισχυρή επιρροή και σε άλλα συστήματα όπως το καρδιαγγειακό, το μυοσκελετικό, το ανοσοποιητικό και το κεντρικό νευρικό (Christensen et al., 2013). Δεν είναι παράδοξο λοιπόν, που παρεκκλίσεις ή παρεμβολές στην οιστρογονική σηματοδότηση σχετίζονται με την παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων των ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων (όπως αυτών του μαστού, των ωοθηκών, και του ενδομητρίου), της οστεοπόρωσης, ορισμένων καρδιαγγειακών νοσημάτων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Christensen et al., 2013).

Τα οιστρογόνα, καθώς και τα αλατοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα, η προγεστερόνη και τα γλυκοκορτικοειδή, ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των στεροειδών ορμονών και έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Τα σημαντικότερα οιστρογόνα που παράγονται από το σώμα είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2) και οι δύο μεταβολίτες αυτής: η οιστρόνη (E1) και η οιστριόλη (E3), τα οποία παράγοντε κυρίως κατά τα αναπαραγωγικά χρόνια, την εγκυμοσύνη και την εμμηνόπαυση, αντίστοιχα (Heldring et al., 2007). Και τα τρία αυτά είδη των οιστρογόνων είναι προσδέτες υψηλής συγγένειας των υποδοχέων των οιστρογόνων, αν και η E2 είναι ο ισχυρότερος αγωνιστής. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες της E2 αν και παλαιότερα ήταν ευρέως αποδεκτό ότι είναι ανενεργοί, σήμερα πολλές μελέτες υποδεικνύουν την ιστοειδική τους δράση (Heldring et al., 2007).

Τα φυσικά οιστρογόνα παράγονται στις ωθήκες, στο πλακούντα, στο φλοιό των επινεφριδίων και στα κύτταρα Leydig (Silbernagl et al. 2010). Συγκεκριμένα, στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, τα οιστρογόνα εκκρίνονται κυρίως από τις ωθήκες, ενώ στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, παράγονται στα επινεφρίδια και στις ωθήκες, από τη μετατροπή των ανδρογόνων, σε οιστρογόνα, με την επίδραση του ενζύμου αρωματάση, η οποία αποτελεί μέλος του κυτοχρώματος P450 που κωδικοποιείται από το *CYP19*, και η ιστοειδική της έκφραση εξαρτάται από ιστοειδικούς υποκινητές στη 5' ρυθμιστική περιοχή 93kb, του γονιδίου (Cui et al., 2013). Η μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα λαμβάνει χώρα, αν και σε μικρότερο βαθμό, και σε πολλούς άλλους φυσιολογικούς ιστούς, όπως στο λιπώδη ιστό, τους μυς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο, καθώς και στα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Τα κυριότερα οιστρογόνα στον ορό είναι η 17β-οιστραδιόλη και η οιστρόνη (Εμμανουήλ Ξυδάκης, 2007).



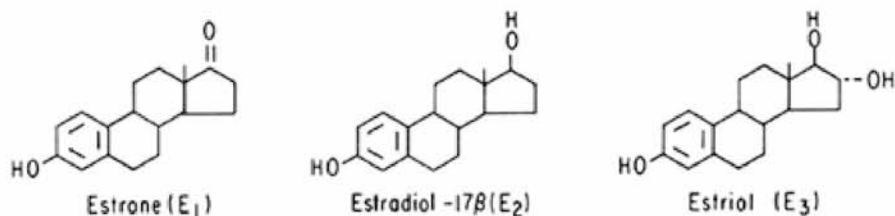
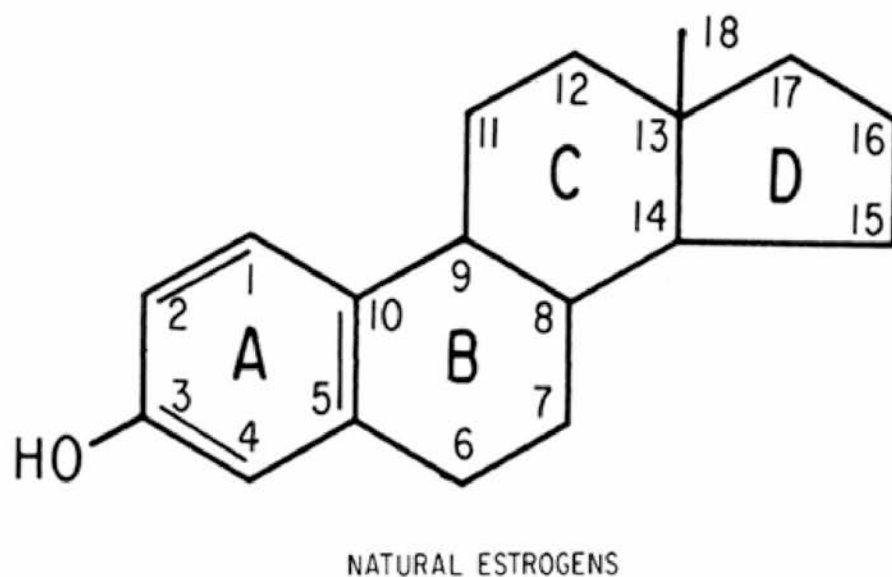
16

Κατά τον μεταβολισμό των οιστρογόνων παράγονται ουσίες που ενοχοποιούνται για την άμεση μεταλλαξιογόνο δράση τους (όπως η 3,4-οιστραδιολ-κυνόνη, που συνδέεται με τις βάσεις γουανίνης και αδενίνης της έλικας του DNA και οδηγεί σε σημειακές μεταλλάξεις) καθώς και ρίζες οξυγόνου που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο DNA. Αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταβολίτες αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη αλλά και στη διατήρηση της νεοπλασματικής διεργασίας, δεν έχει ακόμα αποδειχθεί η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο (Στυλιανός Τσαγκαράκης, 2007).

Η μεταφορά των οιστρογόνων μέσω της περιφερικής κυκλοφορίας γίνεται από τη σφαιρίνη δέσμησης φυλετικών ορμονών (SHBG). Με την άφιξη της στα κύτταρα-στόχους, ως λιπόφιλα μόρια, διαπερνούν τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα μέσω διάχυσης και μεταφέρονται ενδοκυτταρικά (Cui et al., 2013), όπου και προσδένονται στους ERs. Η E2 συγκεκριμένα, προσδένεται σε μία υδρόφοβη περιοχή του ER, όπου τα S1/S2 β-πτυχωτά φύλλα αποτελούν το ένα άκρο πρόσδεσης και η H12 α-έλικα αποτελεί το άλλο άκρο πρόσδεσης (‘‘mouse trap’’ model of ligand binding to nuclear receptors) (Farooq, 2015). Μετά την πρόσδεσή τους στους ERs ασκούν τη δράση τους, μέσω μηχανισμών που λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.

Τα οιστρογόνα είναι χαρακτηρισμένα και ως ‘‘μορφογόνα’’ καθώς ο ρόλος τους στη μορφογένεση είναι έκδηλος από τη παθογενή μορφολογία ιστών (όπως το ενδομήτριο, οι ωοθήκες, ο μαστικός αδένας, ο προστάτης, ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος), ποντικών aERKO και βERKO, δηλαδή ποντικών στα οποία έχει πραγματοποιηθεί σίγηση των γονιδίων που εκφράζουν τον ERα και τον ERβ, αντίστοιχα. Στους υποκινητές ορισμένων γονιδίων, ιδιαίτερος σε αυτών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, ο ERα και ο ERβ, έχουν αντίθετες δράσεις, γεγονός που καταδεικνύει ότι η συνολική πολλαπλασιαστική ικανότητα των οιστρογόνων (και ιδιαίτερα της E2), είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της σηματοδότησης από τον ERα και τον ERβ (Heldring et al., 2007).





**Εικόνα 5.** Η δομή των οιστρογόνων. Όλα τα φυσικά οιστρογόνα έχουν 18 άτομα άνθρακα και ένα φαινολικό δακτύλιο Α με μια ομάδα υδροξυλίου στον C-3. Τρία φυσικά οιστρογόνα (οιστρώνη, οιστραδιόλη και οιστριόλη) (Hammond & Soules, 1979).

## 1.5 Μηχανισμοί δράσης

### 1.5.1 Γενωμική δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων

#### 1.5.1.1 Άμεση σύνδεση στο DNA-κλασσική γενωμική οδός

Όπως προαναφέρθηκε οι ERs δρουν ως προσδετο-εξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντας στον πυρήνα (O'Malley, 2005). Όταν οι ενεργοποιημένοι από τους προσδέτες ERs αλληλεπιδρούν απευθείας με τον υποκινητή/ενισχυτή ενός γονιδίου, τότε η πρόσδεση στα πλήρη EREs, είναι ο κυρίαρχος τρόπος οιστρογόνο-εξαρτώμενης ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων (Kato et al., 1992). Τα EREs αποτελούν ανεστραμμένες επαναλήψεις ανοδικά (13-pb) των γονιδίων, των οποίων η έκφραση υπόκειται σε οιστρογόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση και

συνήθως, τα πλήρη EREs, έχουν τη μορφή GGTCAnnnTGACC (όπου n=οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο) (Driscoll et al., 1998). Τα πλήρη ανθρώπινα EREs έχουν ένα διάστημα-κενό τριών βάσεων μεταξύ των δυο ημι-άκρων (half-sites), με εξαίρεση το στοιχείο απόκρισης του υποκινητή του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα υπεύθυνου για τον μετασχηματισμό των κυττάρων (transforming growth factor-TGF- $\alpha$ ), όπου υπάρχει κενό τεσσάρων βάσεων, καθώς και στον υποκινητή του γονιδίου της λουτροπίνης  $\beta$  από επίμυα, όπου υπάρχει κενό πέντε θέσεων (O'Lone et al., 2004).

Ο χαρακτηρισμός των κανονικών EREs, οδήγησε στην διερεύνηση, μέσω υπολογιστικών προσεγγίσεων, της ταυτοποίησης γονιδίων-στόχων των ERs, βάση της ύπαρξης EREs στην ευρύτερη περιοχή του υποκινητή (Bourdeau et al., 2004). Παρόλα αυτά, σχετική μελέτη από την επιστημονική ομάδα του Klinge (Klinge et al., 2005), ανέδειξε ότι εντοπίστηκαν λειτουργικά EREs, στους υποκινητές ή στη 3'-αμετάφραστη περιοχή των περισσότερων από τα 38 οιστρογόνο-εξαρτώμενα γονίδια, που ταυτοποιήθηκαν, τα οποία δεν είχαν την "κλασσική" αλληλουχία ERE. Έτσι, πολλά γονίδια-στόχοι έχουν στοιχεία απόκρισης, τα οποία μοιάζουν ελάχιστα στην αλληλουχία των "κλασσικών" EREs. Σε μια από τις πιο εκτεταμένες μελέτες, ελέγχθηκαν όλα τα EREs στο γονιδίωμα του ανθρώπου αλλά και του ποντικού και ταυτοποιήθηκαν 70.000 EREs στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Bourdeau et al., 2004; Carroll & Brown, 2006). Εξαιρώντας τα μη συντηρημένα EREs (μεταξύ του ανθρώπου και του ποντικού), ο αριθμός των πιθανών γονιδίων που έχουν EREs στον υποκινητή, μειώθηκε σε 660. Κάποια από αυτά τα EREs ταυτοποιήθηκαν ως γνήσιες περιοχές αλληλεπίδρασης, ενισχύοντας έτσι τη χρήση υπολογιστικών μεθόδων ανεύρεσης πιθανών γονιδίων στόχων του ER (Carroll & Brown, 2006).

Η διαμόρφωση της δομής των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να μεταβληθεί μέσω της σύνδεσής τους με το DNA. Συγκεκριμένες αλληλουχίες ERE μπορούν να ασκήσουν διακριτές, αλλοστερικές επιδράσεις στην διαμόρφωση του ER $\alpha$  και του ER $\beta$  (Hall et al., 2002). Όπως και οι προσδετο-επαγόμενες αλλαγές στη διαμόρφωση των ERs επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με τους συμπαράγοντες, έτσι και η αλληλουχία των EREs επηρεάζει την ικανότητα των ERs να στρατολογούν συμπαράγοντες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο συνενεργοποιητής υποδοχέων στεροειδών-2 (steroid receptor coactivator-2 –SRC-2) αλληλεπιδρά καλύτερα με τον ER $\alpha$  που προσδένεται στα EREs του γονιδίου της βιτελλογενίνης A2 παρά με τον ER $\alpha$  που προσδένεται σε EREs του γονιδίου της βιτελλογενίνης B1 (Wood et al., 2001).

#### *1.5.1.2 Έμμεση σύνδεση στο DNA – μη-κλασσική γενωμική οδός*

Ο μηχανισμός σηματοδότησης μέσω ER που αναφέρθηκε παραπάνω, αφορά την ρύθμιση γονιδίων, τα οποία εμπεριέχουν στον υποκινητή τους μια λειτουργική αλληλουχία ERE (O'Lone et al., 2004). Υπάρχει όμως και μια κατηγορία υποκινητών γονιδίων-στόχων του ER, στους οποίους απουσιάζει η αλληλουχία ERE και απαιτούν την ύπαρξη ενός δεύτερου μεταγραφικού παράγοντα που συνδέεται στο DNA, έτσι ώστε να μεσολαβήσει στην έμμεση σύνδεση του ER με το. Περίπου το 35% των ανθρώπινων γονιδίων-στόχων των ERs μεταγράφονται μέσω αυτού του μηχανισμού (O'Lone et al., 2004).

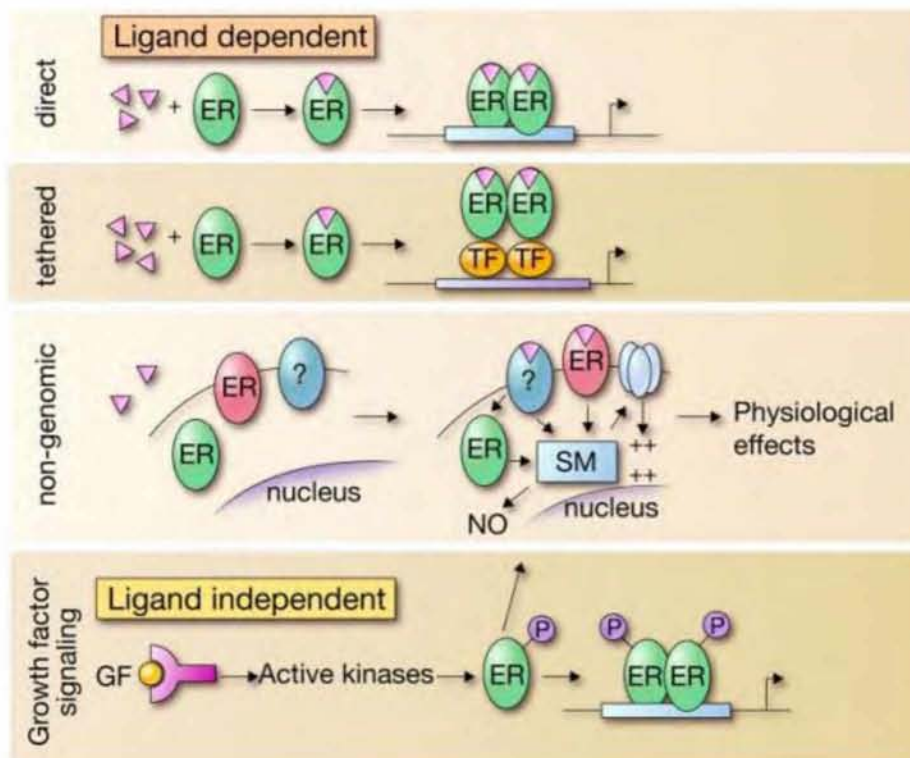
Η πρωτεΐνη (stimulating protein-1 – SP1) είναι ο επικρατέστερος μεσολαβητής της έμμεσης αλληλεπίδρασης των ERs με το DNA (O'Lone et al., 2004) και σε όλο και περισσότερα γονίδια φαίνεται να μεσολαβεί στην από E2 επαγωγή της μεταγραφής τους. Σε απόκριση της οιστρογονικής σηματοδότησης, οι ERs ενισχύουν την σύνδεση της SP-1 σε περιοχές υποκινητών πλούσιες σε GC-αλληλουχίες και βοηθούν στην στρατολόγηση συνενεργοποιητών. Η DBD του ER είναι περιττή σε αυτή τη περίπτωση (Porter et al., 1997). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το γονίδιο του υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein receptor- LDL receptor), της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial nitric oxide synthase – eNOS), του c-fos, της κυκλίνης D1, και του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέως-1α (retinoic acid receptor-1α) (Castro-Rivera et al., 2001; Chambliss & Shaul, 2002; Duan et al., 1998; Li et al., 2001; Zhang et al., 1999).

Άλλο ένα παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση του ERα και της c-rel (υπομονάδας του συμπλόκου του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (nuclear factor-κB-NF-κB)). Αυτή η αλληλεπίδραση αποτρέπει τον NF-κΒ να προσδεθεί στον υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 (interleukin-6 – IL-6) και να ρυθμίσει την έκφραση της (Galien & Garcia, 1997). Έτσι, η E2 αναστέλλει την έκφραση της κυτοκίνης IL-6 (Galien & Garcia, 1997).

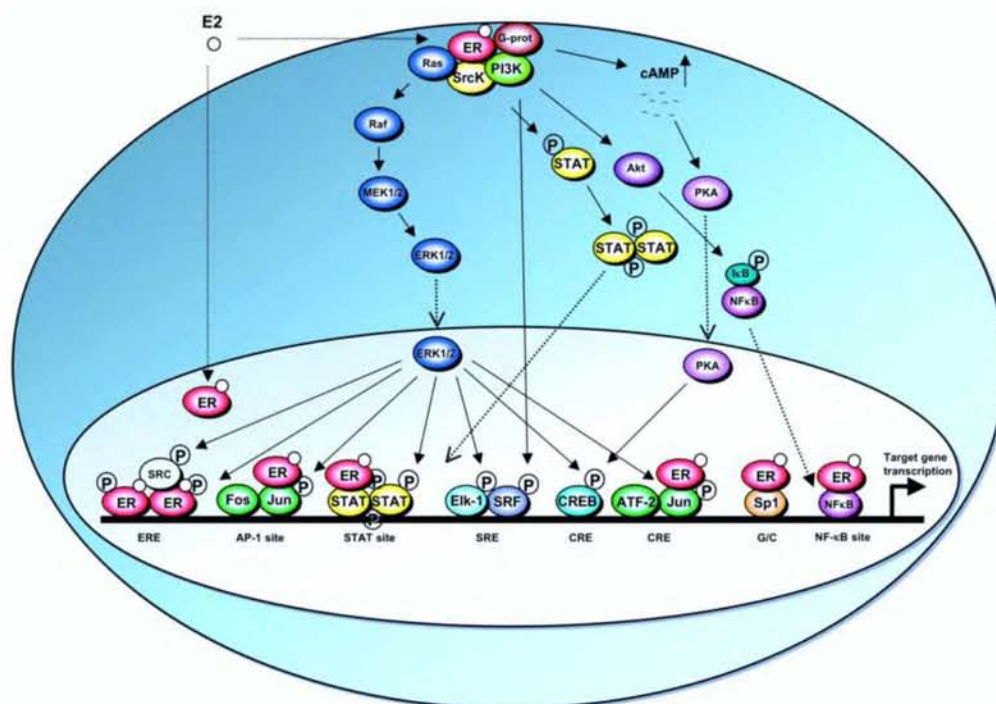
Οι ERs χρησιμοποιούν και αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης για να ρυθμίσουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι γονίδια, τα οποία εμπεριέχουν περιοχές αναγνώρισης από τον μεταγραφικό παράγοντα AP1 (AP1: activator protein-1, πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1) (Gaub et al., 1990). Το σύμπλοκο AP-1, που αποτελείται από ένα ομοδιμερές πρωτεϊνών Jun ή από ένα ετεροδιμερές πρωτεϊνών Jun/Fos, παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Χαρακτηριστικά, η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης-1 (insulin growth factor-1- IGF-1) και του γονιδίου της κολλαγενάσης από τον ERα, γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με τις πρωτεΐνες Jun και Fos στη

περιοχή δέσμευσης AP-1 (O'Lone et al., 2004). Άλλα γονίδια που υπόκεινται στον ίδιο μηχανισμό είναι και το γονίδιο της κυκλίνης D1 και της ωολευκωματίνης (Marino et al., 2002).

Οι ERα και ERβ φαίνεται να δρουν αντίθετα στις περιοχές AP-1. Ο ERα επάγει την AP-1-εξαρτώμενη μεταγραφή, παρουσία E2, ενώ ο ERβ την αναστέλλει (Paech et al., 1997). Μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των AP-1 – στοιχείων απόκρισης από το ERα-E2 σύμπλοκο, απαιτεί και την AF-1 και την AF-2 περιοχή του υποδοχέα, οι οποίες στρατολογούν και ενισχύουν τη δραστηριότητα των παραγόντων p160 (όπως των SRC-1 και SRC-2) του συμπλόκου συνενεργοποίησης, το οποίο στρατολογείται πάνω στις πρωτεΐνες Jun/Fos. Ο ανθρώπινος ERβ, από τον οποίο απουσιάζει η λειτουργικότητα της AF-1 περιοχής, δε μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή AP-1-ρυθμιζόμενων γονιδίων όταν προσδένονται σε αυτόν ανταγωνιστές των ERs, υπονοώντας την επιτέλεση ευδιάκριτων δράσεων των δυο ERs στη ρύθμιση μοναδικών υποσυνόλων γονιδίων (Hall et al., 2002). Παρόμοια με τον AP-1, το σύμπλοκο ορμόνης – ERα υποδοχέα, επάγει την μεταγραφική ενεργότητα όταν αλληλεπιδρά με την Sp-1 σε περιοχές πλούσιες σε GC. Αντίθετα, όταν η E2 προσδένεται στον ERβ, δεν δημιουργείται ένα μεταγραφικά ενεργό σύμπλοκο στους υποκινητές γονιδίων που έχουν Sp-1 στοιχεία. Παράδειγμα, αποτελεί η αντίθετη δράση που έχουν οι ERα και ERβ, παρουσία E2, στην ρύθμιση του υποκινητή της κυκλίνης D1 (Liu et al., 2002). Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η κυκλίνη D1, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εισαγωγή του κυττάρου στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, είναι στόχος που υπόκειται στη δράση του ERα-E2 (Prall et al., 1997), αν και δεν έχουν ανιχνευτεί πλήρεις ή παρόμοιες με EREs αλληλουχίες στον υποκινητή του γονιδίου της. Επίσης, διαγραφή των στοιχείων απόκρισης σε Sp-1 και AP-1 από τον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης D1, οδήγησε σε σημαντική εξασθένηση του υποκινητή στην οιστρογονο-εξαρτώμενη ρύθμισή του (Marino et al., 2003). Αντίθετα, με τον ERα, το σύμπλοκο ERβ – E2 καταστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1 (Acconcia et al., 2005) και αναστέλλει την εξαρτώμενη από το ERα-E2 επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1, όταν και οι δυο ισομορφές είναι παρούσες ταυτόχρονα (Matthews & Gustafsson, 2003). Αυτές οι διαφορές στην μεταγραφική ενεργότητα, μεταξύ ERα και ERβ, μπορεί να είναι υπεύθυνες για την ιστοειδική δράση τους. Αυτή η πολυπλοκότητα ενισχύεται και από την ύπαρξη διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων του ERβ, από την ικανότητα των ERs να σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και από την συγγένεια με την οποία στρατολογούν διαφορετικούς συμπαράγοντες-συρρυθμιστές (Bardin et al., 2004).



**Εικόνα 6.** Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Οι ERs μπορεί να ασκούν τις δράσεις τους με άμεσο τρόπο, συνδεόμενοι απευθείας στο DNA καθώς και με έμμεσο τρόπο, συνδεόμενοι σε μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι έπειτα προσδένονται στο DNA. Επιπλέον, οι ERs δρουν και με μη γενωμικούς μηχανισμούς, που δεν περιλαμβάνουν την άμεση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, αλλά την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μέσα στο κύτταρο. Όλοι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί δράσης είναι προσδετο-εξαρτώμενοι. Τέλος, μπορεί να ασκήσουν τις δράσεις τους με έναν προσδετο-ανεξάρτητο τρόπο και να ενεργοποιηθούν μέσω της φωσφορυλίωσής τους από κινάσες (Heldring et al., 2007).



**Εικόνα 7.** Σχηματική απεικόνιση του τρόπου, με τον οποίο οι γενωμικές και οι μη-γενωμικές δράσεις των ERs μπορούν να συγκλίνουν σε έναν υποκινητή ενός γονιδίου-στόχου της οιστρογονικής σηματοδότησης. Τα πυρηνικά σύμπλοκα E2-ER δεσμεύονται σε EREs και σε σύμπλοκα μεταγραφικών παραγόντων, π.χ. AP-1, STATs, ATF-2 (παράγοντας μεταγραφικής ενεργοποίησης 2) / c-Jun, Sp1 και NF-κB, τα οποία προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις δέσμησης στο DNA. Επίσης, τα σύμπλοκα E2 με μεμβρανικούς υποδοχείς ER ενεργοποιούν καταρράκτες αντιδράσεων πρωτεϊνικών κινασών, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση (P) μεταγραφικών παραγόντων-στόχων, π.χ. AP-1, STATs, Elk-1, SRF (παράγοντας απόκρισης στον ορό), CREB και NF-κB. Η φωσφορυλίωση οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίησή τους και / ή στην αναδιαμόρφωση της μεταγραφικής δραστηριότητας των συμπλόκων ER-AP-1, ER-STAT, ER-Sp1 και ER-NF-κB, τα οποία βρίσκονται προσδεδεμένα στους αντίστοιχους υποκινητές. Επίσης, οι ενεργοποιημένες κινάσες έχουν σαν στόχους τους ίδιους τους ERs και τους συνεργοποιητές τους, με αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα των ERs στα EREs. Οι διακριτές αυτές δράσεις των ERs σε πολλαπλά στοιχεία απόκρισης στο DNA, παρέχουν έναν εξαιρετικά συντονισμένο έλεγχο της ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου (Bjornstrom & Sjoberg, 2005).

### 1.5.1.3 Μεταγραφικοί συμπαράγοντες

Τόσο στις άμεσες όσο και στις έμμεσες γενωμικές δράσεις, οι ενεργοποιημένοι από προσδέτες ERs, , δεν αποτελούν αυτοτελείς μεταγραφικούς ρυθμιστές. Αντίθετα, οι ERs χρειάζεται να αλληλεπιδράσουν με συν- ρυθμιστικές πρωτεΐνες (συνεργοποιητές ή συγκαταστολείς), ώστε να σχηματιστεί μια πλατφόρμα, πάνω στην οποία στρατολογούνται επιπρόσθετες ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Smith & O'Malley, 2004). Οι συμπαράγοντες αλληλεπιδρούν με τους ERs μέσω μοτίβων πλούσιων σε λευκίνες-Leu, (πχ Leu-xxx-xxx-Leu-



Leu, όπου υπάρχει xxx αντιστοιχεί σε οποιοδήποτε αμινοξύ). Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές οικογένειες συμπαραγόντων. Η πρώτη καλά χαρακτηρισμένη οικογένεια συμπαραγόντων αποτελείται από τους SRC-1, SRC-2 και SRC-3. Επιπλέον, οι ακετυλο-τρανσφεράσες των ιστονών (πχ CBP/p300), οι μεθυλο-τρανσφεράσες των ιστονών (πχ CARM1 και PRMT1) και τα σύμπλοκα διαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων (πχ SW1/SNF) είναι αναγκαίοι παράγοντες, ώστε να ανασταλεί η χρωματινο-εξαρτώμενη αναστολή της μεταγραφής γονιδίων (Smith & O'Malley, 2004).

Αν και υπάρχουν αρκετά λιγότεροι συγκαταστολείς των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών (σε σχέση με τους συνενεργοποιητές), αυτά τα μόρια εξυπηρετούν σημαντικούς ρόλους στην αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής των οιστρογόνο-εξαρτώμενων γονιδίων. Πρωτεΐνες που συνδέονται στην AF-2 περιοχή, όπως η πρωτεΐνη p140, ασκούν αρνητική ρύθμιση, διότι μπορούν να ανταγωνίζονται τον SRC-1 στην περιοχή δέσμευσης AF-2 (Johansson et al., 2000). Βέβαια, οι ERs μπορούν να αλληλεπιδρούν και απευθείας με εξειδικευμένους μεταγραφικούς καταστολείς όπως συγκαταστολείς πυρηνικών υποδοχέων και σύμπλοκα απακετυλίωσης ιστονών. Επίσης, η σχετική έκφραση και δράση των συνενεργοποιητών και των συγκαταστολέων, μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα των οιστρογόνων (π.χ. είτε της E2 είτε των επιλεκτικών ρυθμιστών του ER - SERMs) να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων (Smith & O'Malley, 2004).

Λόγω της ομολογίας τους στην περιοχή AF2, τόσο στον ERα όσο και στον ERβ θα έπρεπε να στρατολογούνται παρόμοιοι συνενεργοποιητές, όμως έχουν αναφερθεί πολλές διαφορές. Επίσης, υπάρχει διαφορά στη συγγένεια πρόσδεσης μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών p160, στον ERα σε σχέση με τον ERβ (Smith & O'Malley, 2004).

Ένας αρνητικός μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής περιλαμβάνει ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ERs και των συνενεργοποιητών (π.χ. ακετυλίωση των λυσινών και μεθυλίωση των αργινινών), οι οποίες μπορούν να αναστείλουν την πρόσδεση συνενεργοποιητών στους πυρηνικούς υποδοχείς ή σε άλλους μεταγραφικούς ενεργοποιητές, αλλάζοντας σημαντικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Acevedo & Kraus, 2004). Έτσι, η ακετυλίωση του SRC-3 από την p300 έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δημιουργίας του συμπλόκου υποδοχέα-συνενεργοποιητή, οδηγώντας σε αισθητή μείωση της μεταγραφής γονιδίων στόχων των ERs (Acevedo & Kraus, 2004).

Διάφορα διακυτταρικά μονοπάτια επηρεάζουν, επίσης, τη μεταγραφή γονιδίων από τους ERs, μέσω των αλλαγών στην δομή που προκαλούν στον ER ή στη διαδικασία στρατολόγησης συμπαραγόντων (Smith & O'Malley, 2004). Σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε ότι συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς αποτελούν υπόστρωμα κινάσων και ότι η

φωσφορυλίωσή τους επηρεάζει την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς στεροειδών (Ko et al., 2002).

#### *1.5.1.4 Μη γενωμική δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων*

Το αποτέλεσμα των γενωμικών δράσεων των υποδοχέων των οιστρογόνων γίνεται αντιληπτό μετά από μια μακρά περίοδο, τουλάχιστον δυο ωρών, μετά από την διέγερση από την E2 (Marino et al., 2005). Όμως, μετά την διέγερση των ERs από την E2 αναφέρθηκε αύξηση των επιπέδων του cAMP στη μήτρα ποντικών, σε χρονικό διάστημα 15 δευτερολέπτων (μια δράση πολύ γρήγορη για να αποτελεί προϊόν της γενωμικής δράσης του ER). Αυτή η δράση δεν αναστάλθηκε από αναστολείς της μεταγραφής και ονομάστηκε γρήγορη ή μη γενωμική δράση. Βέβαια, ο όρος μη γενωμική δεν είναι δόκιμος όταν αναφέρεται σε γρήγορες δράσεις, που μπορούν εν τέλει να επηρεάζουν και τη μεταγραφή γονιδίων (Kampa & Castanas, 2006).

Πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια γρήγορων ορμονικών δράσεων ενεργοποιούνται από τη δέσμευση της E2 στους ERs. Αυτές οι γρήγορες δράσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερεις κύριους σηματοδοτικούς καταρράκτες: α) φωσφολιπάση C/πρωτεϊνική κινάση C (phospholipase C - PLC)/ protein kinase C - PKC), β) σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/MAPK, γ) κινάση της τριφωσφορικής ινσιτόλης (phosphatidyl inositol 3 kinase - PI3K)/AKT και δ) cAMP/πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A - PKA) (Alexaki et al., 2006; Incirpi et al., 2003; Klinge et al., 2005; Malyala et al., 2005).

Αυτά τα μονοπάτια αλληλεπιδρούν με μια πληθώρα άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα σύμπλοκο E2-ERα αλληλεπιδρά με τον υποδοχέ IGF-1, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του IGF-1 μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (Kahlert et al., 2000). Επιπλέον, το σύμπλοκο E2-ERα ενεργοποιεί τον υποδοχέα EGF (epithelial growth factor) μέσω μηχανισμών που εμπλέκουν την ενεργοποίηση G-πρωτεϊνών, του Src και μεταλλοπρωτεασών που οδηγούν σε αύξηση της ενεργότητας του PI3K/AKT και της ERK (Kupzig et al., 2005). Σε ενδοθηλιακά κύτταρα, το μονοπάτι Src/PI3K/AKT μεσολαβεί στην οιστρογόνο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της eNOS και στη συνέχεια η απελευθέρωση νιτρικών, οδηγεί στην ενεργοποίηση της AKT και της PKC επηρεάζοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK, μέσω της φωσφορυλίωσης της Raf (Kim & Bender, 2005).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από την E2 είναι ιστοειδική. Έτσι, η δράση της E2 στην ενεργοποίηση της PKC παρατηρείται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου των ποντικών, αλλά όχι στον υποθάλαμο ή στον φλοιό (Ansonoff & Etgen, 1998). Αντίστοιχα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού G-πρωτεϊνών/Src/PI3K/MAPK από την E2 παρατηρήθηκε σε όψιμα και όχι σε πρώιμα,



διαφοροποιημένα λιποκύτταρα. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι διαφορετικές απαιτήσεις σε Src/PI3K ή ενδοκυτταρικό ασβέστιο για την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Kupzig et al., 2005). Επίσης, διαφορετικές ισομορφές της PKC ενεργοποιούνται από τη δράση της E2 σε καρκινικά κύτταρα HepG2 και σε MCF-7, αντίστοιχα (Marino et al., 2001).

Γενικότερα ο ERα αποτελεί το κύριο ενδογενή μόριο απόκρισης των γρήγορων δράσεων της E2. Για το σύμπλοκο E2-ERβ και τον ρόλο του στην ενεργοποίηση γρήγορων (μη-γενωμικών) δράσεων, γνωρίζουμε ελάχιστα. Παρόλα αυτά, μια ισομορφή του ERβ, η οποία υπερεκφράστηκε σε κύτταρα ωοθήκων από κινέζικο χάμστερ (Chinese Hamster) ήταν ικανή να ενεργοποιήσει την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης και να οδηγήσει στην φωσφορυλίωση των ERK και JNK (Razandi et al., 1999). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η E2 μέσω του ERβ, μπορεί να μειώνει την ενεργότητα της ERK σε λεία μυϊκά κύτταρα χοίρων και ότι το σύμπλοκο E2-ERβ μπορεί να ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p38, ένα μέλος της οικογένειας των MAPK πρωτεϊνών, αλλά όχι τις πρωτεΐνες ERK και AKT, σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου (Gerald et al., 2003; Marino et al., 2006). Αν και τα δεδομένα μέχρι στιγμής δεν μπορούν να μας υποδείξουν τον ρόλο και το μηχανισμό, με τον οποίο το σύμπλοκο E2-ERβ συμμετέχει στις γρήγορες δράσεις, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο ERβ μπορεί να επηρεάζει ιστοειδικά αρκετά μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Η ταχύτητα, με την οποία η E2 επάγει γρήγορες αποκρίσεις και επηρεάζει την ταχύτητα της μετατόπισης των σηματοδοτικών συμπλόκων, οδηγεί στην συμμετοχή των μεμβρανικών ERs σε αυτές τις διαδικασίες. Ακόμα, βέβαια, τίθεται το ερώτημα, εάν οι μεμβρανικοί ERs αποτελούν μια διαφορετική ισομορφή του υποδοχέα των οιστρογόνων ή εάν είναι οι πυρηνικοί ERs, οι οποίοι μεταφέρθηκαν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μετά από επιφερόμενες αλλαγές στη δομή τους (Acconcia & Kumar, 2006). Έρευνες υποστηρίζουν ότι ένας μικρός πληθυσμός από ERα και ERβ, που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη το σύμπλοκο E2-ER αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-σκαλωσιάς καβεολίνη-1 (caveolin-1) και ακολουθεί η ενεργοποίηση μιας πληθώρας σηματοδοτικών μορίων (PLC, PKC, ERK, PI3K και της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου-NOS) (Ascenzi et al., 2006). Επειδή, όμως οι ERα και ERβ δεν έχουν trans-μεμβρανική περιοχή, η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, προφανώς οφείλεται στη σύνδεσή τους με μεμβρανικές πρωτεΐνες ή/και σε μετα-μεταφραστική προσθήκη λιπιδικής φύσεως μορίων στον ERα (Acconcia & Kumar, 2006; Ascenzi, et al., 2005).

Τα λιπαρά οξέα και τα ισοπρενοειδή είναι τα κύρια λιπιδικής φύσεως μόρια που εντοπίζονται σε μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται στη μεμβράνη.

Στον ERα και στον ERβ, δεν υπάρχουν αλληλουχίες κατάλληλες για N-ακυλίωση ή S-πρενυλίωση. Όμως, η S-ακυλίωση, δεν προϋποθέτει κάποια ειδική αλληλουχία ως υπόστρωμα, παρά μόνο δραστικά κυστεϊνικά κατάλοιπα, τα οποία υπάρχουν στην LBD των ERα και ERβ (Acconcia et al., 2003). Συγκεκριμένα, η αμινοξική αλληλουχία που βρίσκεται εκατέρωθεν της Cys447 του ERα και της Cys399 του ERβ είναι πολύ συντηρημένη με την αντίστοιχη αλληλουχία του παλμιτοϋλοποιημένου καταλοίπου της Cys132 της ανθρώπινης caveolin-1 (Bijlmakers & Marsh, 2003). Βάση αυτής της παρατήρησης αποδείχθηκε ότι ο ERα υφίσταται S-παλμιτοϋλίωση και αυτό το γεγονός είναι καταλυτικό για τον εντοπισμό του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και για την αλληλεπίδρασή του με τη caveolin-1 (Acconcia et al., 2003). Αξίζει να αναφερθεί ότι και ο ERβ μπορεί να παλμιτοϋλιωθεί (Acconcia et al., 2003).

Επειδή ο ERα δεν έχει ενδογενή δράση κινάσης, ο κυτταροπλασματικός του εντοπισμός προϋποθέτει την αλληλεπίδρασή του με διάφορες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, έτσι ώστε να ενεργοποιηθούν οι ER-επαγόμενες γρήγορες δράσεις. Οι πρωτεΐνες Src, Shc, PELPI (πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη-, γλουταμικό οξύ-, και λευκίνη, αντίστοιχα), MNAR (ρυθμιστής της μη-γενωμικής δραστηριότητας του υποδοχέα των οιστρογόνων - modulator of non-genomic activity of estrogen receptor), η υπομονάδα p85 της PI3K, οι υποδοχείς με δράση κινάση τυροσίνης (π.χ. υποδοχείς του EGF και του IGF), όπως και διάφορες ισομορφές των G-πρωτεϊνών (Gas και Gaq) συμμετέχουν σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεων. Μέσω της μεσολάβησης αυτών των μορίων, η E2 ενεργοποιεί τα μονοπάτια MAPK και PI3K/AKT (Greger et al., 2006; Song et al., 2005).

#### *1.5.1.5 Συνομιλία γενωμικών και μη γενωμικών δράσεων της E2*

Ο μεμβρανικός ER, όπως προαναφέραμε, συμμετέχει ενεργά στις μη γενωμικές δράσεις της E2, όμως επηρεάζει σημαντικά και την πυρηνική, μεταγραφική δραστηριότητα των ERs.

Σε αυτό το πλαίσιο, η ενεργοποίηση της ERK από την E2 ρυθμίζει την AP-1-μεσολαβούμενη έκφραση γονιδίων, όπως π.χ. του c-fos (Yamakawa & Arita, 2004). Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στη ρύθμιση του παράγοντα απόκρισης του ορού/elk-1 (serum response factor/elk-1) από την E2, και επιπροσθέτως από την στρατολόγηση του πυρηνικού ER και διαφόρων συνενεργοποιητών στην περιοχή AP-1 του υποκινητή του γονιδίου (Levin, 2005). Άλλοι στόχοι αποτελούν μόρια σηματοδότησης και ενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως μέλη της οικογένειας STAT πρωτεϊνών, όπως η STAT1, STAT3 και STAT5. Χαρακτηριστικά, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η ενεργοποίηση των STAT3 και STAT5 από την E2, επιτυγχάνεται μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK, PI3K και Src και έχει σαν αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασης της β-καζεΐνης (Bjornstrom & Sjoberg, 2005).

Ομοίως, η ενεργοποίηση της PI3K από την E2, μέσω μεμβρανικών ERs, έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη ρύθμιση εκατοντάδων γονιδίων σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Ανάλυση δεδομένων από πειράματα με χρήση μικροσυστοιχειών έδειξε ότι η έκφραση 250 γονιδίων άλλαξε μετά από τη χορήγηση E2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ο παράγοντας CREB είναι ο πιο καλά μελετημένος μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ενεργοποιείται ταχύτατα από την E2. Σε κύτταρα του ιππόκαμπου (Wade & Dorsa, 2003), σε λιποκύτταρα (Dos Santos et al., 2002) και σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου (Hennessy, Harvey, & Healy, 2005), η E2 επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του CREB, μέσω του μονοπατιού MAPK και ανεξάρτητα από το μονοπάτι PKA και αυτή η αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του CREB επάγει την έκφραση πολλών γονιδίων (όπως του *c-fos*). Αντίθετα, σε νευροβλαστωματικά κύτταρα, η ενεργοποίηση του CREB από τις γρήγορες δράσεις του συμπλόκου ER-E2, εξαρτάται από το μονοπάτι cAMP/PKA και οδηγεί στην έκφραση του γονιδίου της νευροτενσίνης (Watters & Dorsa, 1998).

Επιπλέον, οι ίδιοι οι ERs αποτελούν στόχο των γρήγορων δράσεων του ER. Η E2 μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERs μέσω των κινασών ERK και PI3K (Marino et al., 2005). Η ρύθμιση αυτή της φωσφορυλίωσης του ER, από τις γρήγορες δράσεις της E2, επηρεάζει τόσο τον διμερισμό όσο και την πυρηνική μετατόπιση του ER. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του ERα στην Ser305 επάγει την μεταγραφή του γονιδίου της κυκλίνης D1 στον καρκίνο του μαστού (Marino et al., 2005). Η E2, επίσης, ενισχύει την φωσφορυλίωση του ERα και στη Ser118, Ser167, Tyr537 μέσω μη γενωμικής ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK. Έτσι, το κατάλοιπο Ser167 του ERα, μπορεί να φωσφορυλιωθεί και σε απόκριση της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT από την E2. Αντίστοιχα, η φωσφορυλίωση της Thr311 του ERα, από το οιστρογόνο-επαγόμενο σύμπλοκο p38/MAPK, προωθεί την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα και επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με συγκεκριμένους συνενεργοποιητές (Marino et al., 2005).

Η πολυπλοκότητα των μηχανισμών της δράσης του ER φαίνεται ότι υπόκειται σε έναν λεπτό συντονισμό, ο οποίος ασκείται από τις γρήγορες δράσεις της E2. Συγκεκριμένα, τα εξωπυρηνικά σήματα που επάγονται από την E2 δρουν πριν την εμφάνιση των πυρηνικών δράσεων και επίσης, τα γενωμικά συμβάντα αλλάζουν ανάλογα με το ποιο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται κάθε φορά. Έτσι, η συνομιλία αλληλεπίδρασης αυτών των μοριακών συμβάντων απαιτείται για ώστε να γνωρίζουμε την ολοκληρωμένη κυτταρική απόκριση ως προς τη δράση του συμπλόκου E2-ERs (Marino et al., 2005).

Η πολύπλοκη σχέση μεταξύ γενωμικών και μη γενωμικών δράσεων που επάγονται από την E2, εμπλέκει την φωσφορυλίωση συμπαράγοντων, μέσω μη γενωμικών οδών, με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση αυτών των συμπαράγοντων στο μεταγραφόσωμα (Smith & O'Malley,

2004). Με αυτόν τον τρόπο, ενισχύεται και η στρατολόγηση συνενεργοποιητών, όπως η SRC-1 από τους ERs. Έτσι, υπάρχει μια ελεγχόμενη αλλαγή στη διαμόρφωση του συμπλόκου μεταγραφής που ρυθμίζεται από τις γενωμικές δράσεις του ER και καθορίζεται και από τα πιθανά μονοπάτια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τις μη γενωμικές δράσεις των ERs (Smith & O'Malley, 2004). Πιθανώς, συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια καθορίζουν και την πρόσβαση των συγκαταστολέων στους υποκινητές γονιδίων-στόχων του ER (αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί ικανοποιητικά). Συμπληρωματικά, η πιθανή φωσφορυλίωση των συνενεργοποιητών σε συγκεκριμένα μοτίβα μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της μεταγραφής γονιδίων στόχων του ER, ακριβώς με τον ίδιο τρόπο.

Η πιθανή συνομιλία των γενωμικών και των μη γενωμικών δράσεων του ER παρέχει έναν ολοκληρωμένο έλεγχο της ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων από τον ER. Υπολογίζεται ότι πάνω από 500 κινάσες κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γένωμα (Levin, 2005). Η ικανότητα του συμπλόκου E2-ER να ενεργοποιεί καταρράκτες μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα, αδιαμφισβήτητα έχει αντίκτυπο σε όλες τις λειτουργίες του κυττάρου. Μεταξύ αυτών ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση του κυττάρου, που αποτελούν βασικές διεργασίες για την ομαλή κυτταρική λειτουργία αλλά παίζουν και σημαντικό ρόλο στη βιολογία του καρκίνου (Levin, 2005).

## **1.5.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα**

### ***1.5.2.1 Φωσφορυλίωση του ER***

Αρκετά αμινοξέα είναι στόχοι φωσφορυλίωσης στον ERα, με κυριότερα το S118 και δευτερευόντως το S104, S106, S167 και το S236, αποτελώντας τα κύρια κατάλοιπα φωσφορυλίωσης μετά τη δέσμευση του προσδέτη στη LBD του ERα (Lannigan, 2003). Το S118 και το S167 φωσφορυλιώνονται μέσω των MAPK κινασών αλλά και των κυκλοεξαρτώμενων κινασών CDKs (Ito et al., 2004). Αναφορικά, η φωσφορυλίωση του S118 πιστεύεται ότι αποτελεί ισχυρή ένδειξη για την απόκριση του οργανισμού στην ενδοκρινική θεραπεία σε όγκους του μαστού, ενώ η φωσφορυλίωση του S167 αποτελεί ένα ισχυρό προγνωστικό εργαλείο για την απόκριση στην θεραπεία (Yamashita et al., 2005). Το S236 φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η μετάλλαξη S236E εμποδίζει τον διμερισμό του ERα και τη δέσμευση του στο DNA (D. Chen et al., 1999). Η φωσφορυλίωση του ERα, συνήθως, οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση του ERα υποδοχέα στη θέση S118 συνδέεται με αυξημένη στρατολόγηση της RNA ελικάσης p68 (Endoh et al., 1999). Επίσης, η φωσφορυλίωση του

S118 είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του υποδοχέα από τον παράγοντα ματίσματος 3a p120 (Masuhiro et al., 2005). Η φωσφορυλίωση του ERα από διαφορετικά μονοπάτια κινασών επιδρά με διαφορετικό τρόπο στη σταθερότητα του υποδοχέα, ανάλογα, φυσικά, με την αγωνιστική ή την ανταγωνιστική φύση του προσδέματος στην LBD (Marsaud et al., 2003). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι τόσο η προσδετο-εξαρτώμενη (μέσω των GSK-3 και cdk-7 κινασών) όσο και η προσδετο-ανεξάρτητη (μέσω MAPK κινασών) φωσφορυλίωση της Ser118, επάγει την ουβικουιτινίωση και συνεπώς, την αποδόμηση του ERα (Grisouard et al., 2007, Valley et al., 2005). Όσον αφορά τον ERβ, δύο υπολείμματα σερίνης φωσφορυλιώνονται από το μονοπάτι κινασών MAP και οδηγούν σε ενίσχυση της αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τον συν-ενεργοποιητή SRC-1, απουσία οιστρογόνων (Tremblay et al., 1999).

#### ***1.5.2.2 Ακετυλίωση του ER***

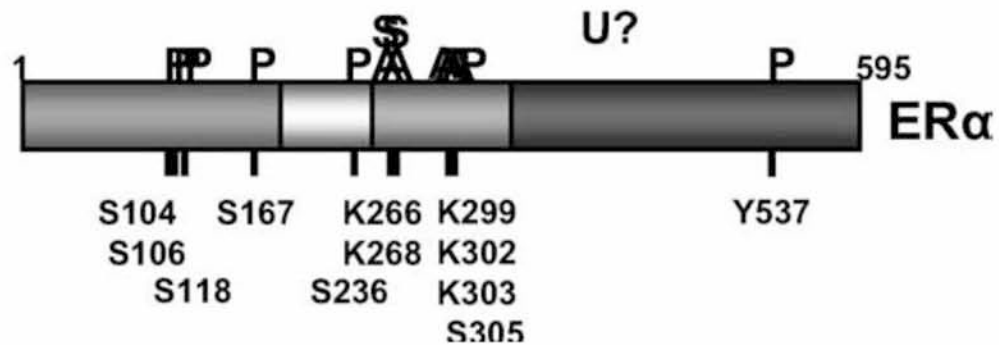
Στον ERα έχουν ταυτοποιηθεί τα κατάλοιπα K266, K268, K299, K302 και K303 ως στόχοι ακετυλίωσης από την p300 (Kim et al., 2006). Η ακετυλίωση των K266 και K268 διεγείρει τη δέσμευση του υποδοχέα στο DNA και αυξάνει την προσδετο-εξαρτώμενη δραστηριότητα σε δοκιμασίες ελέγχου της ενεργοποίησης γονιδίων αναφοράς (reporter gene assays), ενώ η ακετυλίωση των K302 και K303 ελαττώνει την απόκριση σε αγωνιστές. Η μετάλλαξη K303R, η οποία ανιχνεύεται περίπου στο ένα τρίτο των υπερπλασιών του μαστού, ενδεχομένως συνδέεται με την αυξημένη δραστηριότητα αυτής της μορφής. Επίσης, έχει αναφερθεί ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του S305 στην παρεμπόδιση της ακετυλίωσης του K303 και στην απόκριση του ERα στον εκάστοτε προσδέτη (Cui et al., 2004), αλλά και ότι η διαδικασία της ακετυλίωσης είναι αναστρέψιμη (Loven et al., 2004).

#### ***1.5.2.3 Ουβικουιτινίωση του ER***

Η σταθερότητα του ERα επηρεάζεται από τη φύση του συνδεδεμένου προσδέματος και αποτελεί μια διαδικασία που επηρεάζεται από το συμπαράγοντα SRC-3 / AIB1 (Steroid Receptor Coactivator 3 / Amplified in Breast 1) (Reid et al., 2002). Η στρατολόγηση των λιγασών ουβικουιτινίωσης E3 και E6-AP σε μια θέση ενός υποκινητή, στον οποίον έχει προσδεθεί ένας ER, απαιτεί φωσφορυλίωση της Ser118 (Valley et al., 2005). Τέλος, ο ERα, αλλά όχι ERβ, αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα στα αγγειακά κύτταρα των λείων μυών (Liang & Nilsson, 2004).

#### 1.5.2.4 Σουμοϋλίωση του ER

Τα ένζυμα των βιοχημικών οδών σουμοϋλίωσης αλληλεπιδρούν με τον ERα και επάγουν την ενεργοποίησή του (Sentis et al., 2005). Δύο θέσεις σουμοϋλίωσης έχουν εντοπιστεί στην περιοχή άρθρωσης του ERα (K266 και K268) και αυτή η τροποποίηση είναι αυστηρά προσδετο-εξαρτώμενη (Sentis et al., 2005). Είναι σημαντικό, ότι αυτά τα αμινοξέα μπορούν επίσης να τροποποιηθούν με ακετυλίωση, γεγονός που τα αναδεικνύει ως κύρια σημεία ελέγχου της ρύθμισης της δράσης του υποδοχέα οιστρογόνων. Οι πρωτεΐνες PIAS1 και PIAS3 εμπλέκονται στη διαδικασία σουμοϋλίωσης του ERα και μαζί με την πρωτεΐνη Ubc9, δρουν ως συνενεργοποιητές του ERα, ωστόσο αυτός ο ρόλος είναι ανεξάρτητος από την ενζυμική τους δραστηριότητα (Sentis et al., 2005). Σε αντίθεση με ότι παρατηρείται σε άλλους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, η απαλοιφή των θέσεων σουμοϋλίωσης του ERα οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητάς του (Sentis et al., 2005).



**Εικόνα 9.** Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου υποδοχέα των οιστρογόνων και η θέση των εξακριβωμένων ή των πιθανών θέσεων μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Το U? υποδηλώνει ότι δεν έχει εντοπιστεί η ακριβής θέση ουβικιτινυλίωσης. P: Φωσφορυλίωση, A: ακετυλίωση, U: ουβικιτινυλίωση, S: σουμοϋλίωση (Faus & Haendler, 2006).

## 1.6 Μιτοχονδριακή δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων

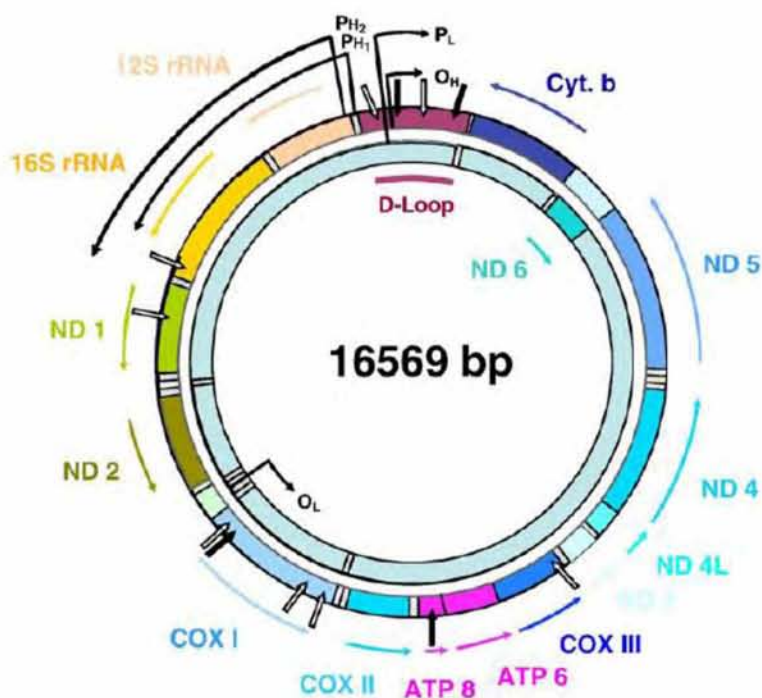
### 1.6.1. Μιτοχόνδρια, μιτοχονδριακό DNA και μιτοχονδριακές λειτουργίες

Τα μιτοχόνδρια είναι πολύ σημαντικά κυτταρικά οργάνδια, καθώς είναι υπεύθυνα για την επιβίωσή του κυττάρου, εφόσον παράγουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, εμπλέκονται σε πολλές

διεργασίες του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Όπως έχει δειχθεί τα μιτοχόνδρια αποτελούν κομβικό σημείο ελέγχου αποκρίσεων του κυττάρου σε καταστάσεις στρες καθώς κατέχουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), στην κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση και τη γήρανση (Psarra & Sekeris, 2008).

Κάθε μιτοχόνδριο φέρει πολλαπλά αντίγραφα ενός κυκλικού δίκλωνου μορίου DNA χωρίς ιντρόνια. Στον άνθρωπο, το κυκλικό αυτό DNA έχει μέγεθος 16.6 kb και φέρει 37 γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση 13 περίπου πρωτεϊνών από τις 3000 που εντοπίζονται συνολικά στα μιτοχόνδρια. Οι πρωτεΐνες αυτές συνιστούν υπομονάδες πρωτεϊνικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ τα υπόλοιπα κωδικοποιούν για δύο rRNAs και 22 tRNAs, απαραίτητων για τη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Bonawitz 2006, Psarra&Sekeris 2008, Chen et al., 2009). Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η βαριά αλυσίδα μεταγράφεται από δύο γειτονικούς υποκινητές που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου, που περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-loop), ενώ η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή (Psarra & Sekeris, 2008).

Στην περιοχή D-loop έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές αλληλουχίες, οι οποίες είναι όμοιες (σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας) με διάφορους πυρηνικούς ενισχυτές, όπως τα HREs, τα CREs και οι αλληλουχίες AP-1 (Psarra & Sekeris, 2008). Έτσι, στη D-loop έχουν βρεθεί 4 πιθανά EREs στο μιτοχονδριακό DNA (mtEREs) (Sekeris 1990), και όπως υποδεικνύεται από μελέτες σε καρκινικά κύτταρα μαστού, στις θέσεις αυτές δύναται να προσδεθεί ο ERα (Chen et al., 2009). Επίσης, σε μιτοχόνδρια εγκεφαλικών κυττάρων του ποντικού και του αρουραίου, έχουν ταυτοποιηθεί 3 πιθανά CREs στην περιοχή της D-loop (Ryu et al., 2005).



**Εικόνα 10.** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών έχει μήκος 16.6 kb και κωδικοποιεί κάποιες από τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την πλήρη λειτουργικότητά του, γι αυτό και βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με τον πυρήνα. Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή (PL), ενώ η βαριά από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 & PH2) που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-loop). Η μεταγραφή που ξεκινά από τους υποκινητές PH2 & PL δίνει πολυκιστρονικά μόρια mRNA που έχουν σχεδόν το μήκος ολόκληρου του mtDNA, ενώ από τον PH1 τα μόρια mRNA έχουν πιο μικρό μήκος (Psarra and Sekeris, 2008).

### 1.6.2 Ρόλος των στεροειδών ορμονών στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν δυο ευδιάκριτοι υπότυποι του υποδοχέα των οιστρογόνων, οι οποίοι αποκρίνονται στα οιστρογόνα και έχουν εντοπιστεί αμφότεροι εντός των μιτοχονδρίων. Αυτή η μιτοχονδριακή τους εντόπιση έθεσε το ερώτημα του ρόλου των ERs στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και ιδιαίτερα στη ρύθμιση της μεταγραφής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η παρουσία των ERs στα μιτοχόνδρια και των EREs στο μιτοχονδριακό DNA υποδεικνύει την εμπλοκή των ERs στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, μέσω της απευθείας σύνδεσής τους στο μιτοχονδριακό DNA γεγονός που έχει



αποδειχθεί, όπως προαναφέρθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Οι μιτοχονδριακοί ERs ενδέχεται επίσης να επιδρούν στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, έμμεσα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικά μόρια του μηχανισμού της μιτοχονδριακής μεταγραφής.

Τόσο οι στεροειδείς όσο και θυρεοειδείς ορμόνες ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων υπομονάδων ενζύμων αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Ο αναπνευστικός πυρηνικός παράγοντας-1 (nuclear respiratory factor-1, NRF-1) είναι μια πρωτεΐνη 68 kDa (Gugneja et al., 1996), η οποία όταν ομοδιμερίζεται προσδένεται σε παλινδρομικά στοιχεία απόκρισης του NRF-1, που βρίσκονται στους υποκινητές πυρηνικά κωδικοποιημένων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων και έτσι ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή ενεργότητα, με ιστοειδικό τρόπο (Scarpulla, 2002). Συγκεκριμένα, ο NRF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση πυρήνα-μιτοχονδρίου, καθώς ελέγχει τη μεταγραφή πυρηνικά κωδικοποιημένων ειδικών μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, όπως τους Tfam, TFB1M και TFB2M (Scarpulla, 2006). Επίσης, ο NRF-1 ελέγχει την έκφραση γονιδίων που αποτελούν 1) κύρια στοιχεία της αντιγραφικής και μεταγραφικής μηχανής του μιτοχονδρίου, 2) κύρια στοιχεία του μηχανισμού εισόδου πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο αλλά και 3) πάνω από 400 γονίδια που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στον μεταβολισμό και στην αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA (Cam et al., 2004; Mattingly et al., 2008).

Παρουσία της E2, οι ERα και ERβ, μπορούν να ρυθμίσουν τα επίπεδα NRF-1 ενδοκυτταρικά, καθώς έχει βρεθεί ότι στον υποκινητή του γονιδίου NRF-1 υπάρχουν EREs (Mattingly et al., 2008). Έτσι, παρουσία E2 αυξάνονται τόσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα όσο και τα επίπεδα mRNA του NRF-1, αλλά παρουσία του ανταγωνιστή του ER, ICI 182,780 αυτή η αύξηση αναιρείται. Επίσης, παρουσία αναστολέων των MAPK (MEK) και της PI3K δεν αναστέλλεται η οιστρογόνο-εξαρτώμενη αύξηση του NRF-1, υποδηλώνοντας ότι η δράση της E2 στην επαγωγή του NRF-1 δεν γίνεται μέσω μη γενωμικών ή μεμβρανικών σηματοδοτικών μονοπατιών των ERs. Έτσι, ο NRF-1 αποτελεί γονίδιο-στόχο της γενωμικής δράσης του ER και η αύξηση του mRNA, αλλά και της πρωτεΐνης NRF-1, είναι ανάλογη με το χρόνο έκθεσης των κυττάρων στην E2 αλλά και τη συγκέντρωση της E2 (Mattingly et al., 2008). Τέλος, φαίνεται ότι η δράση του ERα και του ERβ στον υποκινητή του γονιδίου της NRF-1 είναι αντίθετη, υποδηλώνοντας τη διαφορετική στρατολόγηση συμπαραγόντων από κάθε ER στον υποκινητή, με έναν ιστοειδικό τρόπο και ανάλογα με τον προσδέτη του ER (O'Lone et al., 2007).

Ο NRF-1 ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου του Tfam, καθώς προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης του NRF-1 που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου, με αποτέλεσμα ο Tfam

να αυξάνει τη μεταγραφή μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων γονιδίων στόχων (Scarpulla, 2006). Έτσι, η E2 αυξάνει την πυρηνική μεταγραφή του Tfam σε κύτταρα MCF-7 και επίσης, αυξάνει δυο μιτοχονδριακά κωδικοποιημένα mRNAs τα οποία ρυθμίζονται από τον Tfam: την υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase subunit I – COI) και την υπομονάδα I της αφυδρογονάσης του NADH (NADH dehydrogenase subunit I – NDI) (Mattingly et al., 2008). Έτσι, προτείνεται ένα μοντέλο, στο οποίο η E2 επάγει την έκφραση της NRF-1, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του Tfam, καθώς και του TFB1M και του TFB2M αλλά και των γονιδίων MRC. Αυτά τελικά εισέρχονται στο μιτοχόνδριο και αυξάνουν 1) την έκφραση των μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων γονιδίων, 2) την μιτοχονδριακή βιογένεση και 3) την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Mattingly et al., 2008).

Ο αριθμός αντιγράφων του mtDNA αποτελεί ένδειξη μιτοχονδριακής βιογένεσης. Έτσι, παρουσία E2 παρατηρείται αυξημένος αριθμός αντιγράφων mtDNA και αυξημένο μιτοχονδριακό μέγεθος (Rosario et al., 2008) και επειδή ο Tfam είναι αναγκαίος για την αντιγραφή του mtDNA, επιβεβαιώνεται και η παρατήρηση ότι παρουσία E2 αυξάνονται τόσο τα επίπεδα mRNA του Tfam όσο και ο αριθμός των mtDNAs (Larsson et al., 1998). Η ικανότητα των οιστρογόνων να αυξάνουν την μιτοχονδριακή βιογένεση πιθανόν να είναι ιστοειδική, καθώς σε ποντίκια με ωοθηκεκτομή, η E2 δεν αύξησε τη μιτοχονδριακή βιογένεση, ενώ αντίθετα σε καρδιές ποντικών με αιμορραγικό τραύμα, η E2 και ο αγωνιστής του ERβ, DPN (diarylpropionitrile) αύξησαν τη μιτοχονδριακή βιογένεση, μέσω θετικής ρύθμισης του μιτοχονδριακού ERβ (Hsieh et al., 2006). Επίσης, ο μιτοχονδριακός ERβ αυξάνει τη μεταγραφή του mtDNA και την ενεργότητα των μιτοχονδριακών αναπνευστικών συμπλόκων (mitochondrial respiratory complex – MRC) (Hsieh et al., 2006). Μάλιστα, σε καρδιές ποντικών, η ενεργοποίηση του ERβ από την E2 και τον DPN προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του μιτοχονδριακού αναπνευστικού συμπλόκου IV (MRC-IV, οξειδάση του κυτοχρώματος c) (Hsieh et al., 2006). Επίσης, η E2 αυξάνει τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του παράγοντα PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha) σε διάφορους ιστούς ποντικών. Η PGC-1 αποτελεί κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη της μιτοχονδριακής βιογένεσης (Hsieh et al., 2005).

Δεδομένα που υποστηρίζουν την έμμεση και πιθανώς άμεση δράση των ERs στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής προκύπτουν επίσης από μελέτες που έδειξαν οιστρογόνο-εξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων των υπομονάδων I και II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI και COII), δράση η οποία αναστέλλεται παρουσία του αναστολέα ICI 182,780, υποδηλώνοντας έτσι την ER-εξαρτώμενη πυρηνική φύση του μηχανισμού (Chen et al., 2004). Επίσης, in vivo χορήγηση E2 σε ποντίκια με ωοθηκεκτομή οδήγησε σε αύξηση της αναπνευστικής ενεργότητας σε απομονωμένα μιτοχόνδρια εγκεφάλου, καθώς επίσης οδήγησε και σε αύξηση των επιπέδων

mRNA τόσο των πυρηνικά όσο και των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων του συμπλόκου MRC, δηλαδή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων COXI, COXII και COXIII και των πυρηνικά κωδικοποιούμενων COXIV (Chen et al., 2009). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενη μεταγραφή των τριών υπομονάδων του Συμπλόκου IV αλλά και οι υπομονάδες 6 και 8 της συνθάσης του ATP, ρυθμίζεται από την E2 (Chen et al., 2003). Έτσι, δεδομένης της ύπαρξης ενός μόνο υποκινητή σε κάθε έλικα του mtDNA αλλά και του μεγάλου φάσματος των μιτοχονδριακών μεταγράφων που ρυθμίζονται από την E2, υποδηλώνεται ότι πέρα από την έμμεση πυρηνική δράση των οιστρογόνων στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής πιθανόν να επιτελείται παράλληλα και μία άμεση, καθολική και όχι σε συγκεκριμένα γονίδια δράση της E2 στη μιτοχονδριακή μεταγραφή.

Αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν στο ότι ο ERβ πέρα από τον πυρηνικό εντοπισμό εντοπίζεται και σε σημαντικό ποσοστό και εξωπυρηνικά (Herrick et al., 2006; Milner et al., 2005). Έτσι, τα περισσότερα γονίδια, των οποίων αλλάζει το προφίλ έκφρασης, σε ποντίκια με αποσιωπημένο τον ERβ (ERβ knockout mice) είναι αυτά που κωδικοποιούν δομικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, οι οποίες σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (O'Lone et al., 2007). Επίσης, σε κυτταρική σειρά του ιππόκαμπου ποντικών, στην οποία έγινε αποσιώπηση του ERβ με RNA παρεμβολή, βρέθηκε σημαντική αλλαγή του φαινοτύπου των μιτοχονδρίων (Yang et al., 2009).

Τα οιστρογόνα μπορούν επίσης να ρυθμίσουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία μέσω γρήγορων μη γενωμικών δράσεων. Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι στα πλαίσια της νευροπροστατευτικής δράσης της E2 εμπλέκεται η παροδική ενεργοποίηση : ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των G πρωτεϊνών (Raap et al., 2000), εξωκυτταρικά-ρυθμιζόμενων κινασών (όπως των PI3K ή PKB/AKT, ERK, p38 MAPK) (Singh et al., 2000), η φωσφορυλίωση του παράγοντα CREB (Zhou et al., 1996) αλλά και αλλαγές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ασβεστίου (Sarkar et al., 2008). Αλλαγές στη δραστηριότητα αυτών των ενζύμων-παραγόντων επηρεάζει επίσης τη φωσφορυλίωση 1) πολυάριθμων ενδιάμεσων πρωτεϊνικών σημάτων, όπως την Rsk, την p38 και την JNK και 2) πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως CREB και c fos / c jun (Lee & McEwen, 2001).

Είναι σαφές πλέον ότι υπάρχει μια συνεχής μιτοχονδριακή μετακίνηση (mitochondrial trafficking) ενός μεγάλου αριθμού πυρηνικών υποδοχέων και μεταγραφικών παραγόντων, εκτός των ERα και ERβ, όπως των GR, PPAR γ2, AP1, CREB, NP-κB, p53, TFAM, TFB1M και TFB2M, παράγοντες οι οποίοι προτείνεται ότι ασκούν άμεση ρύθμιση της μεταγραφής μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων (Lee et al., 2008). Δεδομένου ότι τα οιστρογόνα μεσολαβούν στη φωσφορυλίωση διαφόρων σηματοδοτικών μορίων, είναι πιθανό μπορούν να ρυθμίσουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία και τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω διαφόρων μορίων (όπως ήδη έχουν αναφερθεί).

### 1.6.3 Μιτοχονδριακή εντόπιση των υποδοχέων των οιστρογόνων

Με τη χρήση τεχνικών ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοαποτύπωσης κατά Western και φασματομετρίας μάζας σε απομονωμένα μιτοχονδριακά κλάσματα, ταυτοποιήθηκε ο μιτοχονδριακός εντοπισμός των ERs (κυρίως του ER $\beta$ ) σε μια πληθώρα ιστών, συμπεριλαμβανομένων και των ωοθηκών και της μήτρας του κουνελιού, των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του οφθαλμού, των σπερματοκυττάρων, των πρώιμων και μη-νευρώνων του φλοιού του εγκεφάλου, των νευρώνων του ιππόκαμπου, των πρώιμων καρδιομυοκυττάρων, όπως επίσης και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2, SaOS-2, και MCF-7 (Psarra & Sekeris, 2008). Η E2 φαίνεται να επάγει τον εντοπισμό των ERs στα μιτοχόνδρια. Επίσης, και άλλοι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο p53, NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB, wnt, c-src και ο c-myc, έχουν εντοπιστεί μέσα στα μιτοχόνδρια και διαφαίνεται ότι η αλληλεπίδραση του ER με αυτές τις πρωτεΐνες, στα μιτοχόνδρια, μπορεί να έχει επιπτώσεις τόσο στην έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων όσο και σε πολλές άλλες λειτουργίες (Psarra & Sekeris, 2008).

### 1.6.4 Πιθανοί μηχανισμοί εισόδου των υποδοχέων των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια

Η μιτοχονδριακή λειτουργία εξαρτάται μεταξύ άλλων από την είσοδο και την στρατολόγηση πυρηνικά κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών. Η έκφραση πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, όπως μεταγραφικοί παράγοντες και πυρηνικοί συνενεργοποιητές, ρυθμίζουν τη βιογένεση των μιτοχονδρίων μέσω ρύθμιση του συντονισμού δράσεων πυρήνα – μιτοχονδρίων. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στον πυρήνα, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια κατευθύνονται σε υποδοχείς εισόδου στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω μιας αλληλουχίας 20-50 αμινοξικών καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο. Οι πρωτεΐνες που δεν περιέχουν αλληλουχίες σύνδεσης με υποδοχείς του μιτοχονδρίου, αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperons), μέσω ειδικών αλληλουχιών (Simpkins et al., 2008).

Οι πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου της μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Tom). Το σύμπλεγμα Tom αναγνωρίζει αλληλουχίες με trans και cis περιοχές σύνδεσης και μεταφέρει τις πρωτεΐνες μέσα στο μιτοχόνδριο. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από τουλάχιστον 7

υπομονάδες που περιλαμβάνουν υποδοχείς εισόδου και πρωτεΐνες κανάλια. Η Tom20 και Tom70 είναι οι βασικές πρωτεΐνες υποδοχείς του συμπλόκου. Η Tom20 συνδέεται με προ-αλληλουχίες (presequences) προ-πρωτεϊνών (preproteins), ενώ η Tom70 συνδέεται σε εσωτερικές αλληλουχίες μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι Tom20 και Tom22 αναγνωρίζουν ένα μοτίβο xXXxx, όπου x είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ και X ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Η Tom70 θεωρείται υποδοχέας πρωτεϊνών, οι οποίες δεν περιέχουν προ-αλληλουχία καθώς και πρωτεϊνών μοριακών συνοδών, όπως η Hsp70. Οι Hsp70 και Hsp90 συνδέονται σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ή υδρόφοβες προ-πρωτεΐνες και τις μεταφέρουν στη Tom70 μέσω συγκεκριμένων πεπτιδικών επαναλήψεων (tetratricopeptide repeats, TPR) (Simpkins et al., 2008).

Σύμφωνα με τα παραπάνω προτείνονται τρεις πιθανοί μηχανισμοί εισόδου του ERβ στα μιτοχόνδρια: στην πρώτη οδό, ο ERβ που βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή, χωρίς προσδέτη, αλληλεπιδρά με τις Hsp70 και Hsp90 και στη συνέχεια αναγνωρίζεται από την Tom70. Στη δεύτερη οδό, όταν ο ERβ βρίσκεται συνδεδεμένος με τον προσδέτη του, αναγνωρίζεται από τις Tom20/Tom22, μέσω του μοτίβου LXXLL (όπου L λευκίνη) που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (αμινοτελικό άκρο). Τέλος στην τρίτη οδό, όταν ο ERβ βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση συνδεδεμένος με την Hsp70, αλληλεπιδρά με την Tom70 μέσω μιας εσωτερικής ακολουθίας. Αφού περάσει λοιπόν, ο ERβ διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, κατευθύνεται στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου θα μπορούσε να εισέλθει στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Simpkins et al., 2008).

### **1.6.5 Δράσεις των οιστρογόνων στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, της απόπτωσης και αντιοξειδωτικές δράσεις οιστρογόνων**

Τα οιστρογόνα μέσω ελέγχου την έκφρασης τόσο πυρηνικών όσο και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ελέγχουν πολλές πτυχές του ενεργειακού μεταβολισμού, πέραν αυτών της ρύθμισης αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Για παράδειγμα, τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκφραση υπομονάδων των μεταφορέων γλυκόζης, προάγοντας έτσι τη μεταφορά γλυκόζης στους νευρώνες (Mattingly et al., 2008) και επίσης αυξάνουν την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων της εξοκινάσης, της φωσφοφρουκτοκινάσης, της κινάσης του φωσφογλυκερικού (Kostanyan & Nazaryan, 1992). Επιπλέον, τα οιστρογόνα ελέγχουν τα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (Nilsen et al., 2007).

Σύμφωνα με τις δράσεις τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, τα οιστρογόνα ενισχύουν επίσης την έκφραση των υπομονάδων F1 της συνθάσης του ATP. Έτσι, με βάση τα παραπάνω, προκύπτει ότι τα οιστρογόνα προάγουν τη χρήση γλυκόζης μέσω της ρύθμισης πυρηνικά κωδικοποιούμενων γονιδίων (Nilsen et al., 2007).

Επιπλέον, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση παραγόντων απόκρισης στο μιτοχονδριακό στρες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της απόπτωσης μέσω μιτοχονδρίων (Gottipati & Cammarata, 2008). Τα οιστρογόνα αυξάνουν τα επίπεδα των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, Bcl-2 και Bcl-xL, οι οποίες μειώνουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Nilsen & Brinton, 2004). Σε πρωτογενείς νευρωνικές καλλιέργειες, τα οιστρογόνα, μέσω του συμπλόκου E2-ER, ρυθμίζουν και την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-W και μειώνουν την έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bim (Yao, Nguyen, & Pike, 2007).

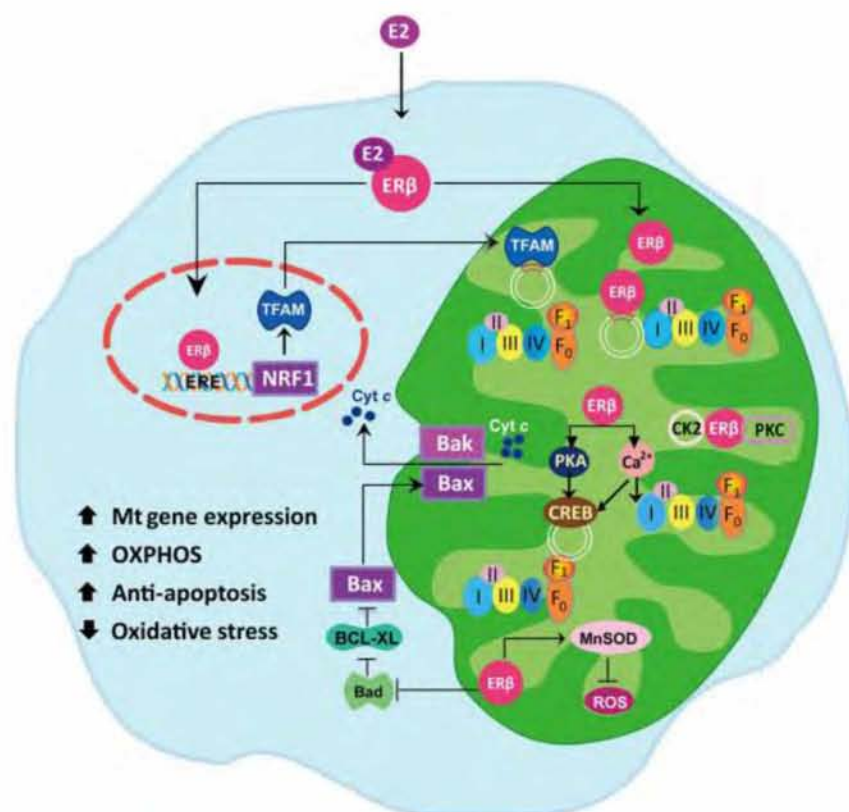
Πέρα από την άμεση δράση της E2 στην ρύθμιση των επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 ομοίως και η οιστρογόνο-εξαρτώμενη αύξηση του NRF-1 συντελεί στην ενίσχυση αντι-αποπτωτικών μηχανισμών (Mattingly et al., 2008). Έτσι, σε καρδιακό ιστό ποντικών, στον οποίο έχει αποσιωπηθεί το ρυθμιζόμενο από τον NRF-1 γονίδιο Tfam παρατηρείται η αναμενόμενη μείωση της μεταγραφής του mtDNA, αλλά και αύξηση της *in vivo* απόπτωσης (Wang et al., 2001). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η επαγόμενη από το σύμπλοκο E2-ER αύξηση της σύνθεσης των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (ETC, electron transfer chain) και κατά συνέπεια η αύξηση του ενεργειακού μεταβολισμού παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της απόπτωσης (Chen, Yager, & Russo, 2005). Επιπλέον, η ισορροπία μεταξύ βιωσιμότητας του κυττάρου και της επαγωγής απόπτωσης αποδείχθηκε ότι εξαρτάται και από την ισορροπία της έκφρασης μεταξύ του c-Myc και του NRF-1. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του c-Myc σε καρκινικά κύτταρα, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα στην επαγωγή απόπτωσης (Morrish, Giedt, & Hockenbery, 2003). Έτσι, ένα ακόμα πιθανός μηχανισμός, με τον οποίο η E2 αναστέλλει την απόπτωση, είναι αυξάνοντας την έκφραση του NRF-1 ώστε να επιτευχθεί αύξηση του λόγου NRF-1/c-Myc.

Τα οιστρογόνα ενισχύουν, επίσης, την άμυνα του κυττάρου έναντι των ελευθέρων ριζών αυξάνοντας την έκφραση και τη δραστικότητα της γλουταρεδοξίνης, της συνθετάσης της γάμμα-γλουταμυλ-κυστεΐνης και της μιτοχονδριακής δισμουτάσης (MnSOD), ένζυμα τα οποία κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια (Gottipati & Cammarata, 2008). Οι δράσεις της E2 σε αυτά τα ένζυμα, αναστέλλεται παρουσία του ICI 182.780, υποδηλώνοντας έτσι την ότι αυτός ο μηχανισμός είναι εξαρτώμενος από τους ERs (Nilsen et al., 2007).

Τα οιστρογόνα έχουν αναγνωριστεί από καιρό ως αντιοξειδωτικά μόρια σε πολλά *in vivo* και *in vitro* μοντέλα, καθώς μπορούν επίσης να αναστείλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων

(Jung et al., 2004), την οξείδωση των πρωτεϊνών (Telci et al., 2002) και τις βλάβες στο DNA (Park, 2004). Επίσης, τα οιστρογόνα αναστέλλουν την επαγόμενη από το σίδηρο υπεροξείδωση των λιπιδίων (Ruiz-Larrea et al., 1995), την οξείδωση της LDL, την οξείδωση της χοληστερόλης και το σχηματισμό συζευγμένου διενίου (Berco & Bhavnani, 2001).

Εκτός από αυτά τα κλασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως τη GSH και τη MnSOD (Borras et al., 2003), η E2 επάγει τη δραστικότητα των οξειδοαναγωγασών θειόλης/δισουλφιδίου (Moorthy et al., 2005), οι οποίες περιλαμβάνουν την δισουλφιδική ισομεράση (protein disulfide isomerase PDI), την θειορεδοξίνη και την γλουταρεδοξίνη επηρεάζοντας έτσι έμμεσα το θειολο-εξαρτώμενο σύστημα αναγέννησης (Ejima et al., 1999). Στο μυελό των οστών αρουραίων, η ωοθηκεκτομή προκαλεί μείωση της ολικής και της ανηγμένης GSH και μείωση στη δραστικότητα της αναγωγάσης της GSH και της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης. Αυτές οι μειώσεις αναιρέθηκαν μετά από τη χορήγηση E2 στους αρουραίους (Lean et al., 2003).



**Εικόνα 11.** Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσεις του μιτοχονδριακού ERβ στη βιοενεργητική, στην μιτοχονδριακή βιογένεση και στην απόπτωση. Ο ERβ εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση καθώς και σε αντι-αποπτωτικές δραστηριότητες. Ο mtERβ μπορεί να αλληλεπιδρά με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, οδηγώντας στην καταστολή της ενεργοποίησης του Bax και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, μέσω ενός προσδετο-εξαρτώμενου ή ανεξάρτητου τρόπου. Επίσης, ο ERβ μπορεί να αλληλεπιδρά με πυρηνικούς στόχους όπως ο πυρηνικός ανασπνευστικός παράγοντας-1 (nuclear

respiratory factor-1, NRF-1) και ο μιτοχονδριακός παράγοντας της μεταγραφής A (mitochondrial transcription factor A, Tfam-A), οι οποίοι ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση. Ο mtERβ πιθανόν να ρυθμίζει την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), είτε μέσω άμεσης σύνδεσης στα mtEREs ή ενεργοποιώντας τη μιτοχονδριακή σηματοδότηση του ασβεστίου και τη φωσφορυλίωση του CREB, είτε έμμεσα μέσω της επαγωγής της έκφρασης του TFAM. Ο mtERβ, επίσης, αναστέλλει τη λειτουργία της Bad, διακόπτοντας τις αλληλεπιδράσεις της με τις Bcl-x(L) και Bcl-2 και οδηγώντας σε αντι-αποπτωτικές δράσεις (Liao et al. 2015).

## 1.7 Ρύθμιση της φυσιολογίας του οργανισμού από τους υποδοχείς οιστρογόνων

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς ελέγχουν μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών βιολογικών διεργασιών στους ιστούς-στόχους του ανθρώπινου οργανισμού. Ωστόσο έχουν ενοχοποιηθεί για πάρα πολλές ασθένειες, ως αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής τους σηματοδότησης τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες. Φαίνεται να εμπλέκονται σε πάρα πολλές μορφές καρκίνου, σε μεταβολικές διαταραχές, σε καρδιακές νόσους, στην οστεοπόρωση και σε νόσους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.

### 1) Αναπαραγωγικό σύστημα

Στα θηλυκά άτομα, διαφέρει τόσο η κατανομή όσο και οι ρόλοι των ERα και ERβ στους μαστικούς αδένες από άτομο σε άτομο. Η παρουσία του ERα στα μαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνη για τον οιστρογόνο-επαγόμενο πολλαπλασιασμό του επιθηλίου και για τη μετέπειτα διαφοροποίησή του. Ο ERβ αδυνατεί να επάγει οιστρογόνο-εξαρτώμενη ανάπτυξη στους μαστικούς αδένες απουσία του ERα (Anderson, 2002). Πιστεύεται ότι ο ERα επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ ο ERβ επάγει τη διαφοροποίηση του ωοθηλακίου. Τα οιστρογόνα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου των ωοθηκών (Cirillo et al., 2013).

Στα αρσενικά άτομα, τα οιστρογόνα είναι απαραίτητα για την σωστή λειτουργία των όρχεων. Ωστόσο η έκθεση στα οιστρογόνα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει διαταραχές τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους. Υψηλά επίπεδα ERβ εντοπίζονται στο ουρογεννητικό σύστημα και στους όρχεις, σε αντίθεση με τα χαμηλά επίπεδα του ERα, ο οποίος είναι απαραίτητος κυρίως για την ανδρική γονιμότητα (Maria et al. 2009).

### 2) Καρδιαγγειακό σύστημα



Τα οιστρογόνα έχουν πλειοτροπικές δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Μερικές από τις πολλές επιδράσεις των οιστρογόνων περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας, της φλεγμονώδους απόκρισης, του μεταβολισμού, της ευαισθησίας της ινσουλίνης και την επιβίωση των μυοκυττάρων της καρδιάς και των βλαστικών κυττάρων (Murphy, 2011). Οι δράσεις των οιστρογόνων επιτυγχάνονται μέσω των μη γενωμικών μηχανισμών σηματοδότησης των ERs. Για παράδειγμα, ο ERα μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K. Επιπλέον μπορεί να επάγει την έκφραση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου. Φαίνεται ότι και το μονοπάτι PI3K αλλά και το ένζυμο συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου δρουν αθροιστικά και έχουν σημαντικό καρδιοπροστατευτικό ρόλο (Murphy, 2011). Η έλλειψη οιστρογόνων από τον οργανισμό έχει συνδεθεί με την αύξηση των καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς έχουν την ικανότητα της ρύθμισης των εγκεφαλικών επεισοδίων και της επίληψίας.

### *3) Ανοσοποιητικό σύστημα*

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς εκφράζονται στα πρωτογενή λεμφικά όργανα και στα διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ο ERα είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του θύμου αδένος και στα δύο φύλα, ενώ ο ERβ πιθανόν να είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της παραγωγής των Β κυττάρων στον μυελό των οστών. Οι οιστρογόνο-επαγόμενες δράσεις των ERs ενισχύουν τη σωστή ανάπτυξη και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα οιστρογόνα πιστεύεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στα αυτοάνοσα νοσήματα. Σημαντικό στοιχείο της ρύθμισης των ανοσοαποκρίσεων αποτελεί η ισορροπία της συγκέντρωσης των οιστρογόνων σε σχέση με τα ανδρογόνα τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά άτομα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα οιστρογόνα ενισχύουν την ανοσοαπάντηση ενώ η τεστοστερόνη την καταστέλλει (Yakimchuk et al., 2013).

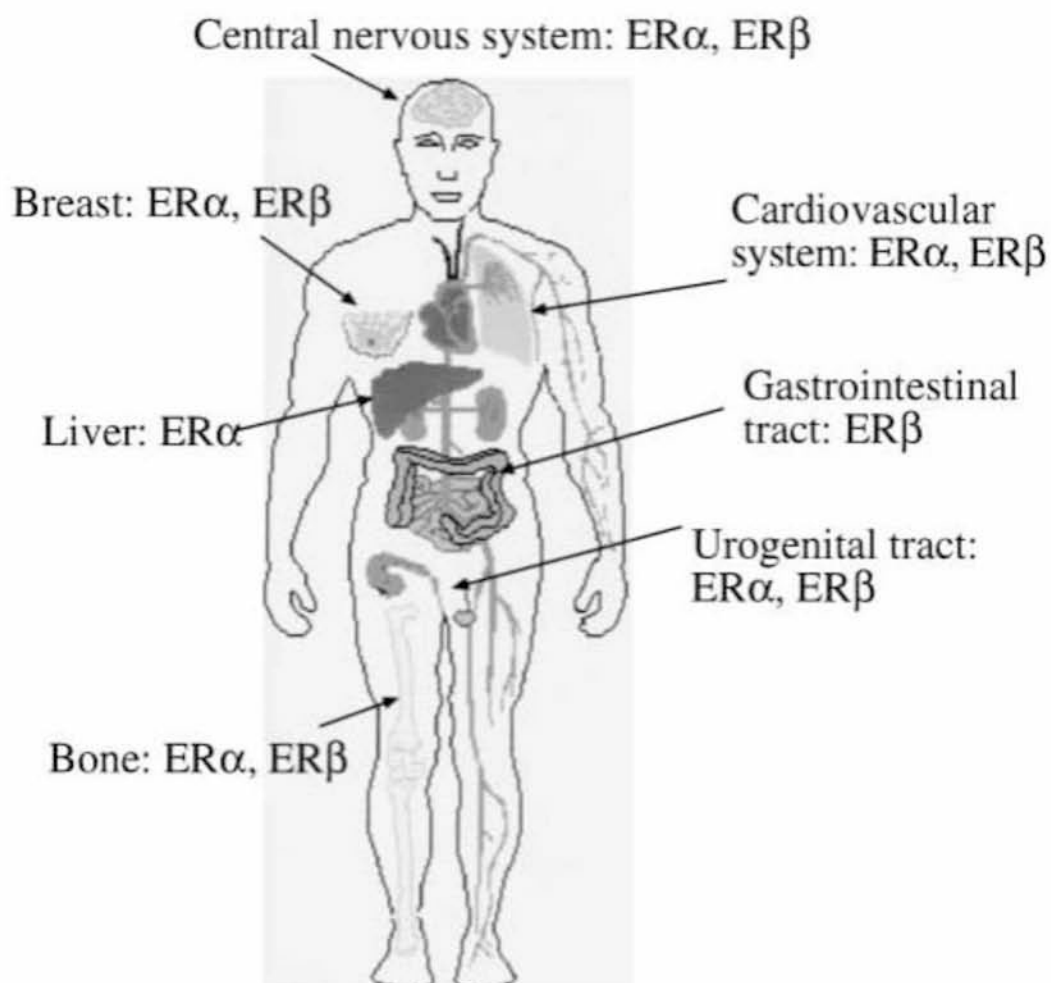
### *4) Κεντρικό νευρικό σύστημα*

Τα οιστρογόνα εκτός των άλλων, επιδρούν και στον εγκέφαλο, επηρεάζουν τις γνωστικές λειτουργίες, τον συντονισμό των κινήσεων και το πόνο και έχουν νευροπροστατευτικό ρόλο. Δρουν ως ισχυροί νευροτροφικοί παράγοντες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και μετά την ενηλικίωση. Επιπλέον, τα οιστρογόνα μπορούν να διαφοροποιήσουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της απόπτωσης και στην αναγέννηση των νευροαξόνων. Τα σχετικά επίπεδα των ERs διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου, με αυξημένα επίπεδα του ERα σε σχέση με τον ERβ στον ιππόκαμπο, στον υποθάλαμο και στο φλοιό (Woolley, 1999). Η οιστρογονική δράση στον εγκέφαλο ασκείται μέσω ER-εξαρτώμενων και ER-ανεξάρτητων μηχανισμών δράσης, οι οποίοι εμπλέκονται στην ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων αλλά και στη ρύθμιση των μη γενωμικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος όπως τα μονοπάτια cAMP/PKA και MAPK. Τα

οιστρογόνα μπορούν να δρουν προστατευτικά ως προς ανάπτυξη ασθενειών, όπως νόσος του Alzheimer, του Parkinson και της σχιζοφρένειας κυρίως λόγω της νευροπροστατευτικής δράσης τους αλλά και μέσω της ενίσχυσης της αναγέννησης των νευρικών κυττάρων και της ενίσχυσης των γνωστικών λειτουργιών του εγκεφάλου (McEwen & Alves, 1999).

#### *5) Σκελετικό σύστημα*

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα οιστρογόνα στον μεταβολισμό και την ομοιοστάση των οστών, επιδρώντας ευεργετικά στην ανάπτυξη του σκελετού αλλά και στη διαφοροποίηση των οστών. Οι οιστρογόνο-επαγόμενες δράσεις ανάπτυξης του σκελετού πραγματοποιούνται από τον ERα, αντίθετα ο ERβ δρα κατά τη διάρκεια της εφηβείας περιορίζοντας την ανάπτυξη των οστών στα θηλυκά άτομα. Ακόμα, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν διάφορους παράγοντες με σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των οστών. Στα θηλυκά άτομα, υπάρχει άμεση σύνδεση της ανάπτυξης της οστεοπόρωσης με την επακόλουθη μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων στο αίμα κατά την εμμηνόπαυση. Οι άντρες με μη λειτουργικούς ERs ή χωρίς την ικανότητα σύνθεσης οιστρογόνων, αποτελούν ευπαθή πληθυσμό για ανάπτυξη οστεοπόρωσης (Rochira et al., 2015).



**Εικόνα 12.** Συνολική κατανομή του ERα και του ERβ σε διαφορετικούς ιστούς (Gustafsson, 1999).

### 1.7.1 Η νευροπροστατευτική δράση της E2

Μελέτες σε θηλυκά ποντίκια έδειξαν ότι όταν μειώνονται τα επίπεδα της E2 στο πλάσμα, λόγω ωοθηκεκτομής, επάγεται η εγκεφαλική βλάβη (λόγω νευροεκφυλιστικών συνθηκών), μειώνεται ο μεταβολισμός της γλυκόζης στον εγκέφαλο και αυξάνονται τα ολιγομερή β-αμυλοειδούς (Ding et al., 2013; Overk et al., 2012). Αντίστοιχα, η αποκατάσταση των επιπέδων E2 στο πλάσμα, με χορήγηση E2 στα ποντίκια με ωοθηκεκτομή, μειώνει την εγκεφαλική βλάβη, επαναφέρει στα φυσιολογικά επίπεδα το μεταβολισμό της γλυκόζης στον εγκέφαλο και μειώνει τον σχηματισμό ολιγομερών β-αμυλοειδούς (Azcoitia et al., 1999; Ding et al., 2013). Επιπλέον, η έκταση της εγκεφαλικής βλάβης, μετά από τη χορήγηση νευροτοξίνης ή την πρόκληση ενός νευροεκφυλιστικού συμβάντος, επηρεάζεται από τις

αλλαγές στα επίπεδα της E2 στο πλάσμα, κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο. Για παράδειγμα, η χορήγηση του νευροτοξικού παράγοντα (καϊνικό οξύ) στην αρχή του οίστρου, μετά από την "κορύφωση" των επιπέδων της E2 στο πλάσμα κατά το τέλος του προ-οίστρου, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της νευρικής βλάβης στον ιππόκαμπο σε σχέση με τη χορήγηση του καϊνικού οξέος στην αρχή του προ-οίστρου, πριν την "κορύφωση" των επιπέδων της E2 στο πλάσμα (Azcoitia et al., 1999). Στους ανθρώπους, η μείωση των επιπέδων της E2 κατά την εμμηνόπαυση, σχετίζεται άμεσα με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νευροεκφυλιστικών και συναισθηματικών διαταραχών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η E2 είναι νευροπροστατευτική και στο ανθρώπινο είδος (Scott et al., 2012). Η ορμονική θεραπεία, η οποία αποτελείται από ένα μίγμα οιστρογόνων και προγεστερονών, χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, όπως των εζάψεων και της κατάθλιψης. Μελέτες που ανέλυσαν τα αποτελέσματα αυτών των θεραπειών, έδειξαν και την επαγωγή της νευροπροστασίας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Sherwin, 2003).

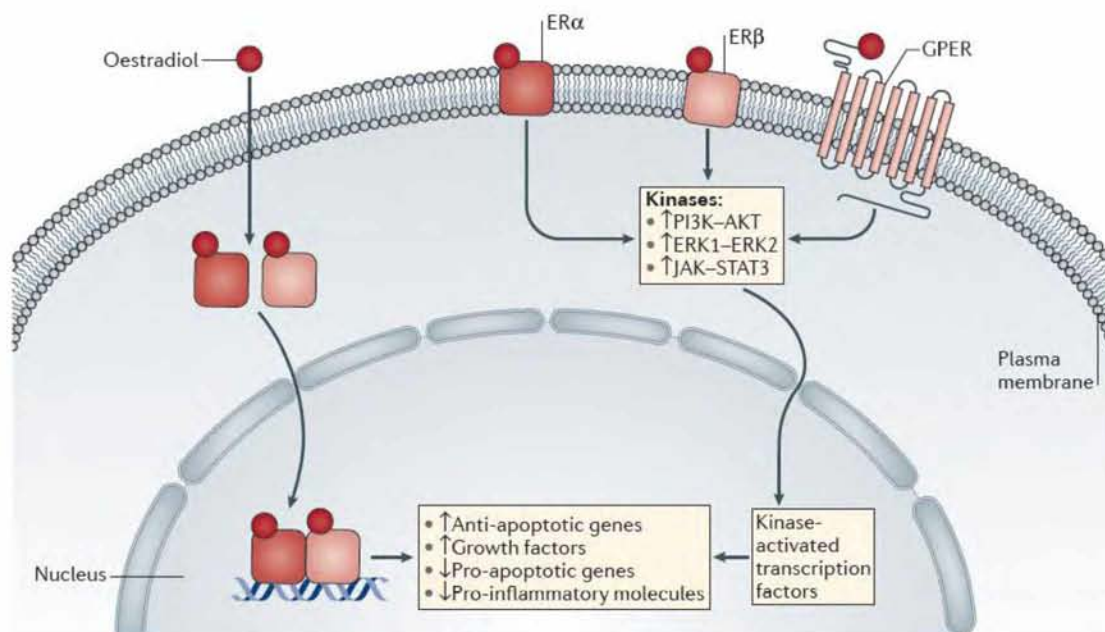
Επίσης, μια σημαντική ένδειξη για τον νευροπροστατευτικό ρόλο της E2 που παράγεται στον εγκέφαλο αποτελεί η αύξηση της έκφρασης και της ενεργότητας της αρωματάσης στον εγκέφαλο ποντικών και πουλιών, σαν απόκριση σε οξεία εγκεφαλική βλάβη. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε αρχικά σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια, στα οποία επήλθε βλάβη στον ιππόκαμπο με τη χρήση τοξικών ουσιών αλλά και στο φλοιό του εγκεφάλου με τη δημιουργία μηχανικών τραυμάτων (Garcia-Segura et al., 1999). Και οι δύο αυτοί τύποι εγκεφαλικής βλάβης οδήγησαν στην αυξημένη ενεργότητα της αρωματάσης στον τραυματισμένο ιστό και στην de novo έκφραση της αρωματάσης στα αστροκύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν την αρωματάση σε ενήλικες επίμυες. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και σε πτηνά, τα οποία αποδείχθηκε ότι υπερεκφράζουν αρωματάση σε ακτινωτά κύτταρα γλοίας και σε αστροκύτταρα μετά από την πρόκληση εγκεφαλικής βλάβης (Peterson, Lee, Fernando, & Schlinger, 2004). Επίσης, οι έρευνες επεκτάθηκαν και σε άλλες μορφές οξείας εγκεφαλικής δυσλειτουργίας των ποντικών, όπως τεχνητά εγκεφαλικά επεισόδια (Carswell et al., 2005), εκτεταμένη ισχαιμία (Zhang et al., 2014) και αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης (Gatson et al., 2011).

Αρκετές πειραματικές προσεγγίσεις έχουν διενεργηθεί με σκοπό να διερευνηθεί η λειτουργία στην αύξηση της σύνθεσης και της δραστηριότητας της αρωματάσης μετά από μια εγκεφαλική βλάβη. Η δημιουργία ποντικών ArKO (aromatase knockout) και η συστηματική χορήγηση αναστολέων της αρωματάσης ανέδειξε την νευροπροστατευτική της δράση (Azcoitia et al., 2001; Li et al., 2011). Όμως, σε αυτά τα μοντέλα δεν μπορεί να διαχωριστεί η δραστηριότητα της περιφερικής αρωματάσης από την αρωματάση του εγκεφάλου. Έτσι, πιο άμεση ένδειξη του νευροπροστατευτικού ρόλου της E2 στον εγκέφαλο, παρέχουν τα πειράματα, στα οποία μειώθηκε η σύνθεση E2 στον εγκέφαλο, μετά από ενδοεγκεφαλική χορήγηση αναστολέων

της αρωματάσης. Τα πειράματα αυτά, έδειξαν μείωση στα επίπεδα της εγκεφαλικής E2 και αύξηση της εγκεφαλικής βλάβης μετά τη πρόκληση διαφορετικών νευροεκφυλιστικών ερεθισμάτων στους εγκεφάλους των πτηνών και των θηλαστικών (Azcoitia et al., 2001). Επίσης, με τη χρήση της μεθόδου αποσιώπησης RNAi (RNA interference), επετεύχθη η αναστολή της έκφρασης της αρωματάσης και της σύνθεσης της E2 στον ιππόκαμπο ποντικών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα απώλεια των νευρώνων και της γλοίωσης του ιππόκαμπου και εκτεταμένη εγκεφαλική ισχαιμία (Zhang et al., 2014). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι ο εγκέφαλος επάγει τοπικά τη σύνθεση της E2 μετά από πρόκληση βλάβης και αυτό αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενή νευροπροστατευτικό μηχανισμό.

Ένα σημαντικό στοιχείο, το οποίο αξίζει να αναφερθεί, είναι ότι η εγκεφαλική οιστραδιόλη εμφανίζει νευροπροστατευτική δράση, τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά ζώα. Στα αρσενικά, η αρωματάση μπορεί να χρησιμοποιήσει την τεστοστερόνη που υπάρχει στην κυκλοφορία, ως πρόδρομο μόριο για την σύνθεση E2. Έτσι, από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, φαίνεται ότι μόλις η τεστοστερόνη περάσει τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier – BBB), μπορεί να μετατραπεί σε οιστραδιόλη, στα αστροκύτταρα (Garcia-Segura et al., 1999). Επίσης, οι εγκέφαλοι τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών ποντικών, εκφράζουν ένζυμα που συμμετέχουν στη στεροειδογένεση και μπορούν να παράγουν τεστοστερόνη από χοληστερόλη. Έτσι, τα επίπεδα της E2 στον εγκέφαλο που έχει υποστεί βλάβη, εξαρτώνται από τα επίπεδα της τεστοστερόνης στην κυκλοφορία (κυρίως στα αρσενικά άτομα), από τα επίπεδα της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία (κυρίως στα θηλυκά άτομα) και στη στεροειδογόνο δραστηριότητα του εγκεφάλου, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τρόπο ζωής και το φύλο του κάθε ατόμου (Stanic et al., 2014).

Η σημασία της αρωματάσης ως νευροπροστατευτική μόριο στους ανθρώπους υποδηλώνεται και από την ύπαρξη γενετικών παραλλαγών (αλληλομόρφων) του ενζύμου, που προσδίδουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου του Alzheimer (Medway et al., 2014). Αυτές οι γενετικές παραλλαγές της αρωματάσης μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη σύνθεση της οιστραδιόλης στον εγκέφαλο, η οποία μαζί με τα μειωμένα επίπεδα της οιστραδιόλης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή τα μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης σε ηλικιωμένους άνδρες, ενδέχεται να αυξήσουν τον κίνδυνο για πιθανή ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Luchetti et al., 2011).



**Εικόνα 13.** Η νευροπροστατευτική σηματοδότηση που προκαλείται από τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Η οιστραδιόλη επάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων και των νευροπροστατευτικών αυξητικών παραγόντων και καταστέλλει την έκφραση των προ-αποπτωτικών γονιδίων και προ-φλεγμονωδών μορίων στον εγκέφαλο. Αυτή η δράση της ορμόνης προκαλείται από δύο κύριους μηχανισμούς: α) τη δέσμευση της E2 στους ενδοκυττάριους υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ) και την επακόλουθη ρύθμιση της ER-εξαρτώμενης μεταγραφής, και β) τη δέσμευση της E2 στους μεμβρανικούς υποδοχείς των οιστρογόνων (GPER) και την επακόλουθη ρύθμιση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων από την σηματοδότηση PI3K -AKT, από την σηματοδότηση ERK1-ERK2 και από τη σηματοδότηση JAK-STAT3 (Arevalo et al., 2015).

### 1.7.3 Κύριοι νευροπροστατευτικοί οδοί σηματοδότησης

Στη νευροπροστατευτική δράση της E2 συμμετέχουν τόσο οι κλασσικοί όσο και οι μη κλασσικοί μηχανισμοί δράσεις των ERs. Έτσι, αποδείχτηκε ότι τις νευροπροστατευτικές δράσεις της E2 μπορούν να μιμηθούν επιλεκτικοί αγωνιστές των ERα, ERβ και GPER αλλά αντίστοιχα, αυτές οι νευροπροστατευτικές δράσεις μπορούν να παρεμποδιστούν από ανταγωνιστές των ERs, από την σίγηση της έκφρασης των ERs αλλά και από την εξάλειψη των ERs (ER knockdown) (Spence et al., 2013; Tang et al., 2014; Zhang et al., 2009). Δεν είναι σαφές εάν όλες οι ισομορφές των ERs συμμετέχουν στις προστατευτικές δράσεις της E2 σε όλα τα μοντέλα νευρικού εκφυλισμού και ανάλογα με το μοντέλο, κάποια μόρια φαίνεται να παίζουν σημαντικότερο ρόλο από κάποια άλλα (Simpkins et al., 2012). Για παράδειγμα,

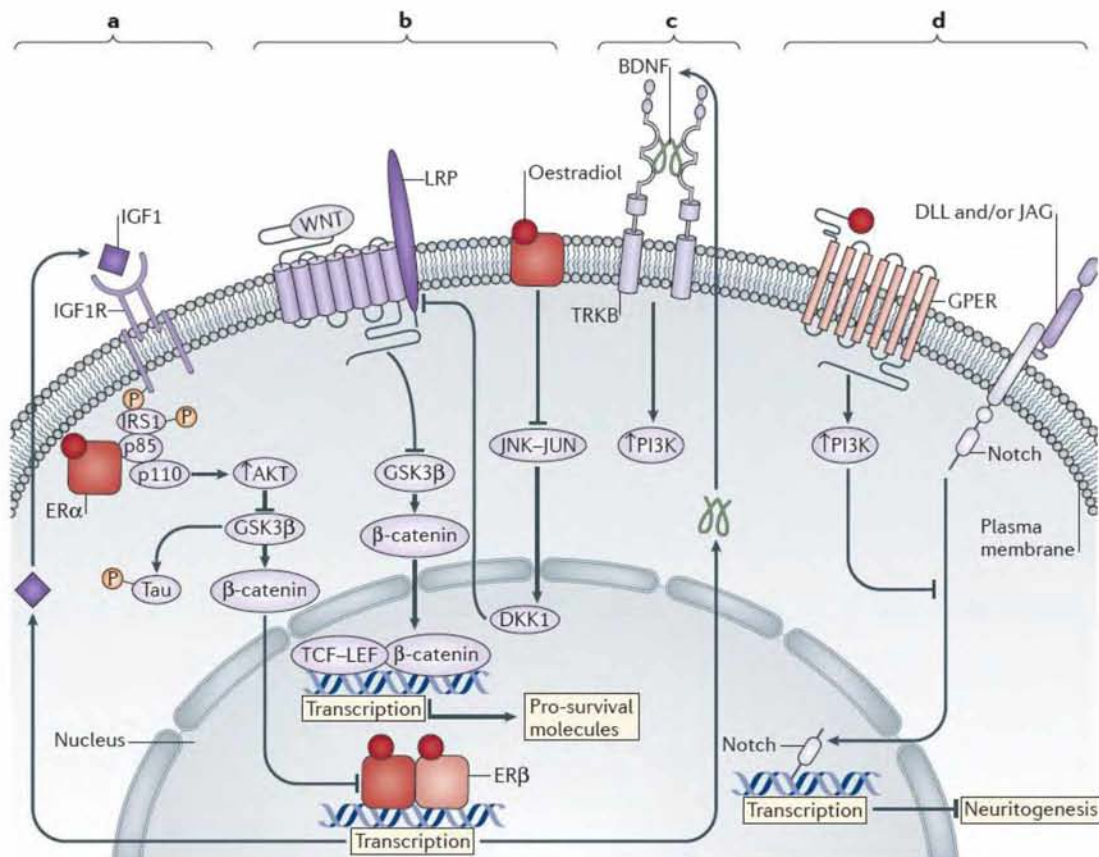
αποδείχθηκε ότι ο ERα, και όχι ο ERβ, εμπλέκεται στην νευροπροστατευτική δράση της E2 σε μοντέλα ισχαιμίας, που προήλθε από την ήπια απόφραξη της εγκεφαλικής αρτηρίας σε ποντίκια (Dubal et al., 2001). Όμως, τόσο ο ERα όσο και ο ERβ εμπλέκονται στην E2-εξαρτώμενη επαγωγή της νευρογένεσης (μετά από ισχαιμία) και στη νευροπροστατευτική δράση της E2 μετά από εκτεταμένη εγκεφαλική ισχαιμία σε ποντίκια (Carswell et al., 2004).

Οι ERα, ERβ και GPER ενεργοποιούν παράλληλους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της ERK1 και ERK2, των νευροπροστατευτικών σηματοδοτικών οδών της PI3K και της αναστολής της προ-αποπτωτικής JNK (Tang et al., 2014; Yang et al., 2010; Zhao & Brinton, 2007). Μελέτες σε πρωτογενείς φλοιώδεις νευρώνες έδειξαν ότι η E2 ενεργοποιεί τα νευροπροστατευτικά σηματοδοτικά μονοπάτια ERK1-ERK2 και PI3K παράλληλα στους ίδιους νευρώνες, ενώ η αναστολή της σηματοδότησης είτε μέσω ERK1-ERK2 είτε μέσω PI3K καταργεί τις νευροπροστατευτικές δράσεις της E2 σε διάφορα νευροεκφυλιστικά μοντέλα (Mannella & Brinton, 2006; Tang et al., 2014).

Ένας σημαντικός παράγοντας του νευροπροστατευτικού μηχανισμού της E2 είναι η ρύθμιση των μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο της απόπτωσης. Στον εγκέφαλο, η E2 ρυθμίζει θετικά την έκφραση των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2, όπως τις Bcl-2, Bcl-xL (Koski et al., 2004) και Bcl-w (Yao et al., 2007), ενώ ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως τις Bad (Gollapudi & Oblinger, 1999) και Bim (Yao et al., 2007). Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ μεσολαβούν στην E2-εξαρτώμενη επαγωγή της έκφρασης της Bcl-2 στους νευρώνες του υπόκαμπου (Zhao et al., 2004). Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών ERK1-ERK2 και του PI3K από τους ERs οδηγούν στη μείωση της έκφρασης της BAD και στη θετική ρύθμιση του BCL-2. Η ενεργοποίηση των ERs επάγει, επίσης, τη μεταγραφή του *BCL2* και ενός άλλου αντι-αποπτωτικού γονιδίου, της *survivin*, μέσω του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (signal transducer and activator of transcription 3-STAT3), ενός μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος μεσολαβεί στις νευροπροστατευτικές δράσεις της E2 σε πειράματα εγκεφαλικής ισχαιμίας (Sehara et al., 2013). Επιπλέον, μερικά μέλη της οικογένειας BCL-2, όπως η BCL-W και η BIM, ρυθμίζονται από την οιστραδιόλη μέσω της αναστολής του παράγοντα JNK (Yao et al., 2007). Επίσης, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (glycogen synthase kinase 3β-GSK3β) αποτελεί πιθανό στόχο για τη θεραπεία του νευροεκφυλιστικών νόσων, δεδομένου του ρόλου της στον νευροεκφυλισμό και στις διαδικασίες αναγέννησης των νευρώνων (Seira & Del Rio, 2014). Ένα αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής ενεργοποίησης της GSK3β σε νευροεκφυλιστικές νόσους αποτελεί η υπερφωσφορύλωση της πρωτεΐνης Tau. Αυτό το γεγονός αποτελεί τη κύρια αιτία της δυσλειτουργίας της πρωτεΐνης Tau στη νόσο του Alzheimer αλλά και σε άλλες

εγκεφαλοπάθειες (Arevalo et al., 2015). Η ενεργότητα της GSK3β ρυθμίζεται με τη φωσφορυλίωση διαφόρων αμινοξικών υπολειμμάτων και μειώνεται με τη φωσφορυλίωση της Ser9 από την AKT. Η αναστολή, δε, της ενεργότητας της GSK3β αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό νευροπροστασίας από διάφορους παράγοντες, όπως τους WNT, IGF1 και την οιστραδιόλη. Η οιστραδιόλη, μέσω των ERα και GPER, ενεργοποιεί τη PI3K στον εγκέφαλο και στους πρωτογενείς νευρώνες. Η PI3K, με τη σειρά της, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT, η οποία φωσφορυλιώνει-αναστέλλει την GSK3β και μειώνει την φωσφορυλίωση της Tau (Cardona-Gomez et al., 2004). Εκτός από τη μείωση της φωσφορυλίωσης της Tau, η νευροπροστατευτικές δράσεις της αναστολής της GSK3β εμπλέκουν και τη ρύθμιση της β-κατενίνης. Τα επίπεδα της β-κατενίνης ρυθμίζονται από την οιστραδιόλη μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης ERα-PI3K-AKT-GSK3β. Μελέτες σε κύτταρα του νευροβλαστώματος έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT-GSK3β επάγει τη μετατόπιση της β-κατενίνης στον πυρήνα του κυττάρου (Perez-Alvarez et al., 2012). Έτσι, η β-κατενίνη αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του ERα (Mendez & Garcia-Segura, 2006) και ρυθμίζει, γενικά, τη μεταγραφική ενεργότητα μέσω του παράγοντα T κυττάρων (T cell factor-TCF) και του παράγοντα LEF (lymphoid enhancer-binding factor-LEF) (Varea et al., 2009). Το γονίδιο που ρυθμίζονται από την οιστραδιόλη, μέσω αυτού του μηχανισμού, είναι παρόμοια αλλά όχι ταυτόσημα με το σύνολο των γονιδίων που ρυθμίζονται από το μονοπάτι σηματοδότησης WNT (Varea et al., 2009).





**Εικόνα 14.** Η οιστραδιόλη μεσολαβεί στην ρύθμιση άλλων οδών νευροπροστατευτικής σηματοδότησης. Α) Η οιστραδιόλη (E2) ενεργοποιεί τη νευροπροστατευτική δράση του IGF1R (Insulin-like growth factor 1-receptor) μέσω της αύξησης της μεταγραφής του IGF1 και της επαγωγής της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ERα και της καταλυτικής υπομονάδας της PI3K, τη p85. Αυτό επιτρέπει τον σχηματισμό ενός συμπλόκου που αποτελείται από τον ERα, τον IGF1R και συστατικά της οδού σηματοδότησης του IGF1R, όπως το υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης 1 (IRS1), την PI3K, την AKT και την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3β (GSK3β). Μέσω αυτής της οδού, η οιστραδιόλη ρυθμίζει την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Tau και προκαλεί τη σταθεροποίηση της β-κατενίνης. Επιπλέον, παρουσία της οιστραδιόλης, ο IGF1 μειώνει την μεταγραφική δραστηριότητα του ERα μέσω της οδού σηματοδότησης PI3K-AKT-GSK3β-β κατενίνης. Β) Η οιστραδιόλη ενεργοποιεί τη σηματοδότηση WNT αναστέλλοντας την έκφραση του παράγοντα Dickkopf 1 (DKK1), ενός μορίου που δεσμεύεται στον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών (LRP) και αποτρέπει τον σχηματισμό του συμπλόκου σηματοδότησης του WNT. Η αναστολή της έκφρασης της DKK1 από την οιστραδιόλη γίνεται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού JNK –JUN, (μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει και τους μεμβρανικούς ERs). Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης WNT από την οιστραδιόλη έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της GSK3β και τη μετατόπιση της β-κατενίνης στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα μέσω του παράγοντα των T κυττάρων (TCF) και του παράγοντα δέσμευσης των λεμφοειδών ενισχυτών (LEF), επάγοντας την έκφραση μορίων επιβίωσης. Γ) Η οιστραδιόλη επάγει τη μεταγραφή του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (BDNF). Δ) Η οιστραδιόλη, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τον μεμβρανικό ER (GPER) και την PI3K, αναστέλλει τη σηματοδότηση Notch στον πυρήνα και προάγει τη νευριτογένεση (Arevalo et al., 2015).

### 1.7.4 Οι υποδοχείς των οιστρογόνων στο καρκίνο του μαστού

Ο όρος «καρκίνος του μαστού» αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σήμερα το πιο διαδεδομένο είδος καρκίνου για το γυναικείο φύλο, καθώς το 27,8% του γυναικείου πληθυσμού διαγιγνώσκεται με αυτή την ασθένεια. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άρρενες είναι υπαρκτή αλλά πολύ μικρή. Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του μαστού στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ορμονο-εξαρτώμενος, καθώς οι ορμόνες έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Bai et al., 2008).

Τα οιστρογόνα θεωρείται ότι προάγουν την νεοπλασματική ανάπτυξη αφενός μέσω αύξησης των παραγόντων που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αφετέρου μέσω της μείωσης των παραγόντων που τον καταστέλλουν. Επιπρόσθετα αναστέλλουν την απόπτωση μέσω της αύξησης της έκφρασης αντί-αποπτωτικών γονιδίων, όπως για παράδειγμα το bcl-2 (Στυλιανός Τσαγκαράκης, 2007). Επίσης, η αύξηση του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης, μειώνει τη πιθανότητα επιδιόρθωσης των σφαλμάτων της DNA πολυμεράσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων στο DNA. Έτσι, η δράση των οιστρογόνων στα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην εγκαθίδρυση νέων μεταλλάξεων στο γονιδίωμα αλλά και την αναπαραγωγή αυτών.

Έχει δειχθεί ότι τα οιστρογόνα διεγείρουν την κυτταρική ανάπτυξη στο καρκίνο του μαστού και η δράση τους αυτή επιτυγχάνεται χάρις την μεγάλη αύξηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0/G1, δηλαδή των κυττάρων που εισέρχονται τον κυτταρικό κύκλο. Η μιτογόνο δράση των οιστρογόνων ασκείται μέσω της σύνθετης ρύθμισης της μεταγραφικής λειτουργίας πολλών γονιδίων. Σε καρκίνο μαστού πρώιμου σταδίου επάγεται, μέσω του κλασσικού γενωμικού μηχανισμού, η έκφραση αυξητικών παραγόντων και η έκφραση γονιδίων που περιέχουν ERE στοιχεία στον υποκινητή τους. Επιπρόσθετα, ασκείται ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που δεν περιέχουν ERE στοιχεία με μηχανισμούς αλληλεπίδρασης των ER με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο c-Jun. Μελέτες που έγιναν σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων μαστού, έδειξαν οιστρογόνο-επαγόμενη έκφραση γονιδίων όπως το γονίδιο της Κυκλίνης D1, μέσω της αλληλεπίδρασης της AP-1 και του ER. Μερικά από τα γονίδια που έχουν μιτογόνο δράση περιλαμβάνουν αυτά των αυξητικών παραγόντων, των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, των πρωτεασών, των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdks) (Platet et al., 2004).

### 1.7.5 ERα στον καρκίνο του μαστού

Ο ERα παρουσιάζει πολύ μεγάλη έκφραση από τα πρώτα μόλις στάδια της καρκινογένεσης, σε ποσοστό περίπου στο 50-80% των περιπτώσεων ασθενών με καρκίνο του μαστού και εκφράζεται τόσο στα πορογενή όσο και στα λοβιακά καρκινώματα. Με τη βοήθεια πειραμάτων σε ποντίκια, στα οποία έχει γίνει σίγηση του ERα, αποδείχθηκε ότι ο ERα προωθεί την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Στις διαδικασίες αυτές εμπλέκονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK και PI3K/Akt που στόχο έχουν την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση του ERα (Cirillo et al., 2013).

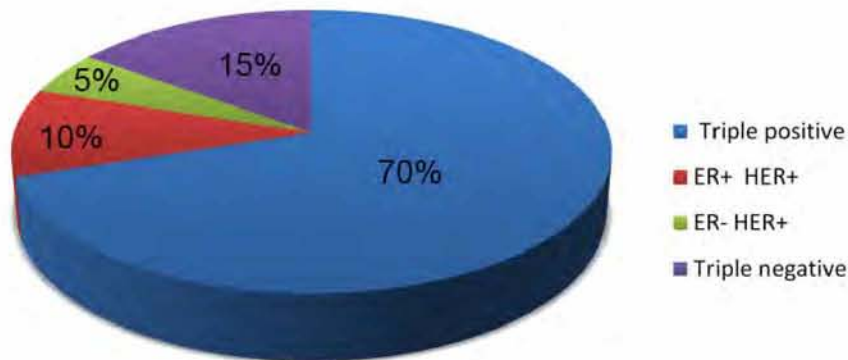
Η επαγωγή των επιδράσεων του ERα προϋποθέτει την σύνδεση με ένα προσδέτη. Μελέτες έδειξαν, παρουσία της E2, ο ERα ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου c-myc, p45, Κυκλίνη D και το γονίδιο της Κυκλίνης E. Η αναστολή του ERα με τη χορήγηση της Ταμοξιφαίνης προκαλεί μείωση της έκφρασης της Κυκλίνης D1 και του c-myc, το οποίο καταστέλλει τη πρωτεΐνη Bcl-2, η οποία έχει ρόλο επιβίωσης στα κύτταρα και έτσι αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος (Dey et al., 2013).

Μελέτες έδειξαν ότι ο ERα μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει με ταχύτατους ρυθμούς την έκφραση του πρώτο-ογκογονιδίου c-fos σε καρκινικά κύτταρα μαστού παρουσία E2 ή και αυξητικών παραγόντων. Έχει βρεθεί ότι ο ERα, σε αυτήν την περίπτωση, πρέπει να έρθει σε επαφή με την SP-1 περιοχή πλούσια σε CG, καθοδικά της παλίνδρομης ERE αλληλουχίας στον υποκινητή του πρώτο-ογκογονιδίου c-fos. Το πρώτο-ογκογονίδιο αυτό εκφράζει την πυρηνική πρωτεΐνη c-fos, η οποία φυσιολογικά εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και του κυτταρικού μετασχηματισμού. Η πρωτεΐνη c-fos αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη c-jun, σχηματίζοντας το ετεροδιμερές σύμπλοκο της AP-1, η οποία μπορεί να προσδεθεί σε ειδικές περιοχές γονιδίων-στόχων, ρυθμίζοντας την έκφραση τους. Επίσης έχει ταυτοποιηθεί ότι η πρωτεΐνη c-fos ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων, υπεύθυνων για την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο, όπως είναι η Κυκλίνη D1 (Maggiolini et al., 2004).

Επίσης, κατά τη μη γενωμική σηματοδότηση, ο ERα, επάγει την ενεργοποίηση διαφόρων κινασών όπως της Src, της MAPK, της PI3K και της PKC. Πολλές από αυτές τις κινάσες εμπλέκονται στα μονοπάτια που προωθούν τη μετάσταση στο καρκίνο του μαστού. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο μεμβρανικός ERα αλληλεπιδρά με τους αυξητικούς παράγοντες IGF-1 R, EGFR και με τον HER2. Αυτή η αλληλεπίδραση παίζει ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Saha et al., 2011).

### 1.7.6 ERβ και καρκίνος του μαστού

Σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, ο ERβ εκφράζεται σε ποσοστό 80%. Αυτό δεν συμβαίνει κατά την εξέλιξη καρκίνου του μαστού, γεγονός που οφείλεται σε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα, προκαλώντας έτσι την απενεργοποίηση του. Σε *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, βρέθηκε ότι ο ERβ αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτυγχάνεται μέσω της αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI3K αλλά και μέσω της ρύθμισης της έκφρασης παραγόντων υπεύθυνων για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και για την απόπτωση. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ERβ επάγει τη ανασυγκρότηση του πρωτεασώματος και την επακόλουθη αποικοδόμηση του ERα, αναστέλλοντας έτσι την ενεργότητά του (Jia et al., 2015). Ωστόσο, σε μία άλλη μελέτη που έγινε πάνω σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, υποστηρίζεται ότι η έκφραση του ERβ συνδέεται με την αυξημένη έκφραση της ιντερλευκίνης 8, η οποία ανήκει στην κατηγορία των κυτοκινών και παίζει ρόλο στην αύξηση της αγγειογένεσης και της μετάστασης σε καρκινώματα (Chen et al., 2011).



**Εικόνα 15.** Σχηματική απεικόνιση των κατηγοριών και των ποσοστών των καρκίνων του μαστού ως προς την συμμετοχή των υποδοχέων ERs, PRs και HERs. Παρατηρούμαι ότι στην πλειοψηφία των διαφόρων τύπων του καρκίνου του μαστού συμμετέχουν οι υποδοχείς των οιστρογόνων στη δημιουργία, την εξέλιξη αλλά και στη μετάσταση των καρκίνων αυτών. Ως Triple positive (τριπλός θετικοί) προσδιορίζονται οι καρκίνοι του μαστού στους οποίους συμμετέχουν και οι τρεις

προαναφερθέντες υποδοχείς, ενώ ως Triple negative (τριπλώς αρνητικοί) προσδιορίζονται οι καρκίνοι του μαστού στους οποίους δε συμμετέχει κανένας υποδοχέας (Huang et al., 2000).

## **1.8 Μόρια με οιστρογονική δράση**

### **1.8.1 Φυτοοιστρογόνα**

Τα φυτοοιστρογόνα είναι μη-στεροειδικές πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες παράγονται φυσικά από τα φυτά. Διακρίνονται σε τέσσερεις κύριες οικογένειες : τις φλαβονοειδή, τα στυλβένια, τις κουμεστάνες και τις λινγίνες. Επειδή εμφανίζουν πολλές δομικές και χημικές ομοιότητες με την οιστραδιόλη, μπορούν να ασκούν οιστρογονική ή αντιοιστρογονική δράση, μέσω της σύνδεσής τους με τους ERs στην LBD, παρεμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση της οιστραδιόλης (Peeters et al., 2003). Η genistein και η coumestrol φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη εξειδίκευση για τον ERβ, καθώς μπορούν να προσδένονται ισχυρότερα στην LBD του ERβ σε σχέση με την LBD του ERα. Τα φυτοοιστρογόνα παίζουν προστατευτικό ρόλο σε παθήσεις, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές νόσοι και η οστεοπόρωση, όμως σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους ιστούς αυτούς μπορούν να προκαλέσουν διαταράξεις στον μεταβολισμό, κυρίως λόγω κυτταροτοξικότητας (Peeters et al., 2003).

### **1.8.2 Ξενοοιστρογόνα**

Τα ξενοοιστρογόνα (xenoestrogens) είναι γενικώς γνωστά ως τεχνητά, μη στεροειδή οργανικά χημικά μόρια, τα οποία εντοπίζονται στο νερό, σε φαρμακευτικά σκευάσματα, σε βιομηχανικά απόβλητα, σε εντομοκτόνα, σε πρόσθετα τροφίμων, σε καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης, στην βιομηχανική επεξεργασία και σε απόβλητα συμπεριλαμβανομένων των οργανοχλωρινικών εντομοκτόνων, πολυχλωριομένων διφαινυλίων, αλκυλφαινολών και parabens (συστατικό πολλών προϊόντων σωματικής υγιεινής που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση). Τα χημικά αυτά είναι γνωστά ως ενδοκρινικοί "διαταράκτες" και η επίδραση που έχουν στην ανθρώπινη υγεία βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα. Τα περισσότερα από αυτά τα οργανικά μόρια με οιστρογονική δράση φέρουν συχνά φαινολικούς, οι οποίοι συμβάλλουν στην οιστρογονική ενεργότητά τους, μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με τις αμινοξικές αλυσίδες του ER (Darbre, 2005).

Εκτός από τα ενδογενή οιστρογόνα, στο περιβάλλον συναντάμε και ενώσεις που μοιάζουν δομικά με αυτά (Albini et al., 2014) και έχουν την τάση είτε να μιμούνται μερικώς τις δράσεις τους, είτε να δρουν παρεμβατικά στην οιστρογονική σηματοδότηση (Kerdivel et al., 2013). Έτσι, τα ξενοοιστρογόνα μπορούν να επηρεάσουν το ενδοκρινικό σύστημα ποικιλοτρόπως, ανάλογα με την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται τα ενδογενή οιστρογόνα, για τις θέσεις πρόσδεσης στους υποδοχείς οιστρογόνων (Albini et al., 2014). Η έκθεση της μήτρας στη φαρμακευτική ουσία DES, που χορηγούνταν παλαιότερα στις γυναίκες ως φαρμακευτική αγωγή διαφόρων παθολογικών καταστάσεων αλλά και ως βοηθητικού παράγοντα για τη μείωση των περιπλοκών στην εγκυμοσύνη, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ξενοοιστρογόνου, το οποίο αποδείχθηκε υπεύθυνο για τις σοβαρές δυσμορφίες και διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος των παιδιών τους.

Τα ξενοοιστρογόνα θεωρούνται (κλινικά) πολύ σημαντικά, λόγω της ικανότητάς τους να μιμούνται τις δράσεις των ενδογενών οιστρογόνων. Οι οργανισμοί εκτίθενται σε μεγάλο βαθμό στα ξενοοιστρογόνα, τα οποία βρίσκονται σε προϊόντα που καταναλώνουμε ή ακόμα και στο περιβάλλον (Darbre, 2005). Για αυτό το λόγο έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση πρώιμης ήβης και άλλων διαταραχών στο αναπαραγωγικό σύστημα. Η έκθεση σε ξενοοιστρογόνα κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια έχει επιπτώσεις στα συστήματα που υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση (όπως το νευρικό και το αναπαραγωγικό) (Kerdivel et al., 2013) ενοχοποιώντας τα έτσι για την παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών.

### 1.8.3 Μεταλλοοιστρογόνα

Τα μεταλλοοιστρογόνα, τα οποία αποτελούν μια υποκατηγορία των ξενοοιστρογόνων, είναι μικρές ανόργανες ενώσεις στην μορφή ιόντων βαρέων μετάλλων και ασκούν οιστρογονική δράση στον οργανισμό. Μελέτες υποδεικνύουν ότι ιόντα βαρέων μετάλλων, τα οποία απορροφήθηκαν από τον οργανισμό μέσω διαφόρων περιβαλλοντικών πηγών, μπορούν να μιμηθούν τη δράση των ενδογενών οιστρογόνων και πιθανός να επάγουν τη μεταγραφική δραστηριότητα των υποδοχέων των οιστρογόνων (Darbre, 2005). Χαρακτηριστικά παραδείγματα μεταλλοοιστρογόνων αποτελούν τα κατιόντα αργιλίου, βáriου, κάδμιου, χρωμίου, κοβαλτίου, υδραργύρου και νικελίου, καθώς και τα ανιόντα αρσενικού και βαναδίου (Darbre, 2006b). Κύριες πηγές έκθεσης στα μεταλλοοιστρογόνα αποτελούν το νερό, τα τρόφιμα, τα τσιγάρα, τα φάρμακα οι βιομηχανικοί ρύποι και πολλά είδη κοσμετολογίας. Τέλος, τα μεταλλοοιστρογόνα, στοχοποιούνται για διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Έχουν παρατηρηθεί υψηλές συγκεντρώσεις μεταλλοοιστρογόνων σε



συγκεκριμένους ιστούς, όπως ο μαστός, όπου και γίνεται ένας σαφής συσχετισμός των επιπέδων των μεταλλοοιστρογόνων με τη δημιουργία και την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού (Darbre, 2006a).

#### 1.8.4 Μηχανισμοί δράσης μεταλλοοιστρογόνων

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, ο ER είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος σχηματίζει δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) και επομένως η δράση του στηρίζεται στη σχέση πρωτεΐνης-μετάλλου. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία δομή που περιλαμβάνει δύο δακτυλίους ψευδαργύρου, όπου ο κάθε ένας σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες δύο ζευγαριών κυστεϊνικών καταλοίπων που συνδέονται με ένα άτομο ψευδαργύρου. Η σύνδεση οιστρογόνου- ER, γίνεται στη LBD (Ligand Binding Domain), κατόπιν, ο υποδοχέας διμερίζεται και μέσω των δακτύλων ψευδαργύρου αλληλεπιδρά με τα στοιχεία EREs (Estrogen Response Elements) στο DNA επηρεάζοντας τη μεταγραφή γονιδίων που φέρουν τα στοιχεία αυτά ή μέσω άλλων μηχανισμών ελέγχει την έκφραση και άλλων γονιδίων (Darbre, 2005, 2006b).

Τα διάφορα μέταλλα που έχουν δράση μεταλλοοιστρογόνων έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη δράση του ER με ποικίλους τρόπους. Κάποια μπορεί να πάρουν τη θέση του ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ικανότητα της DBD του υποδοχέα να προσδένεται σε κάποιο ERE. Κάποια άλλα μέταλλα έχουν την ικανότητα να προσδένονται με την LBD και κατά συνέπεια να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την 17β-οιστραδιόλη (Darbre, 2005, 2006b).

Ένα αρκετά καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο μεταλλοοιστρογόνου, αποτελούν τα ιόντα καδμίου. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει μια πληθώρα πιθανών μηχανισμών, μέσω των οποίων τα ιόντα καδμίου ασκούν την οιστρογονική τους δράση (Byrne et al., 2009). Τα ιόντα καδμίου μπορούν να μπλοκάρουν την σύνδεση της οιστραδιόλης στον ERα με μη ανταγωνιστικό τρόπο, υποδηλώνοντας έτσι, ότι αλληλεπιδρά με την LBD του υποδοχέα και πιο συγκεκριμένα αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα cys381, cys447, glu523, his524 και asp538 (Byrne et al., 2009). Τα μέταλλα εξυπηρετούν πολλές διαφορετικές λειτουργίες των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της συμμετοχής τους σε καταλυτικές αντιδράσεις και στη σταθεροποίηση της πρωτεϊνικής δομής. Έτσι μέσω των αλληλεπιδράσεων με διαφορετικά αμινοξέα, τα μέταλλα μπορούν να προάγουν τοπικά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση του δακτύλου ψευδαργύρου. Τα αμινοξέα, τα οποία παίζουν ρόλο στην

αλληλεπίδραση του κάδμιου με τον ERα, βρίσκονται στις έλικες H4, H8, H11 και στην έλικα H12 (Byrne et al., 2009). Οι κυστεΐνες 381 και 447 εντοπίζονται στις έλικες H4 και H8 αντίστοιχα, ενώ το γλουταμικό οξύ 523 και η ιστιδίνη 524 εντοπίζονται στην έλικα H11 και H12, αντίστοιχα (Byrne et al., 2009). Αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το κάδμιο ενεργοποιεί τον ERα παραμένει αδιευκρίνιστος, είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση του μετάλλου με αυτά τα αμινοξέα προκαλεί δομικές αλλαγές που μιμούνται τις δομικές αλλαγές που επάγονται κατά τη σύνδεση της οιστραδιόλης στον ERα μέσω της LBD (Byrne et al., 2009).

Το ασβέστιο είναι ένα δισθενές κατιονικό μέταλλο και αποτελεί δεύτερο αγγελιοφόρο στις οδούς μεταγωγής σήματος. Επίσης, το ασβέστιο μπορεί να ενεργοποιήσει τον ERα, απουσία οιστραδιόλης. Σε αντίθεση με την οιστραδιόλη που δεσμεύεται στον θύλακα της LBD, το ασβέστιο δεσμεύεται και ενεργοποιεί τον ERα μέσω θέσεων στην επιφάνεια της LBD (Divekar et al., 2011). Οι θέσεις αλληλεπίδρασης με το ασβέστιο βρίσκονται στα άκρα των ελίκων που επανατοποθετούνται κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση του ασβεστίου με αυτές τις θέσεις επάγει μεταβολή στη διαμόρφωση της LBD παρόμοια με αυτή που προκαλεί η πρόσδεση της οιστραδιόλης (Divekar et al., 2011). Έτσι, δισθενή κατιονικά μόρια, όπως το κάδμιο, μπορούν να ανταγωνιστούν το ασβέστιο και να ασκήσουν την οιστρογονική τους, με βάση τον προαναφερθέντα μηχανισμό. Μάλιστα, κάποια κατίοντα μπορούν να προσδεθούν με μεγαλύτερη συγγένεια στην LBD, από ότι το ασβέστιο (Byrne et al., 2009).

Επίσης, εκτεταμένες μελέτες κατέδειξαν ότι τα μεταλλοοιστρογόνα ενεργοποιούν τον ERα, επάγοντας τόσο τις γενωμικές όσο και τις μη-γενωμικές (γρήγορες) οδούς. Ιόντα όπως το κάδμιο, ο ψευδάργυρος και το χρώμιο μπορούν να επάγουν τον πολλαπλασιασμό οιστρογόνο-εξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων του μαστού, επάγοντας τη μεταγραφή και την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από οιστρογόνα, όπως ο υποδοχέας προγεστερόνης, (PR) και επάγοντας τη σηματοδότηση μέσω των σηματοδοτικών οδών ERK1/2 και PI3K/Akt (Liu et al., 2008; Wilson et al., 2004). Εκτός από την ενεργοποίηση του ERα, υπάρχουν ενδείξεις, ότι το κάδμιο ενεργοποιεί τον μεμβρανικό υποδοχέα οιστρογόνων GPR30.

Τέλος, ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των μεταλλοοιστρογόνων, μέσω του ERα, είναι η αλληλεπίδραση των μεταλλικών ιόντων με την περιοχή AF-1. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η περιοχή AF-1, αλληλεπιδρά και με μέλη της p160 (μιας οικογένειας συνενεργοποιητών των υποδοχέων στεροειδών), όπως: μέλη της SRC-1 (ERAP160/NCoA-1), της SRC-2 (TIF2/GRIP1/NCoA-1), και της SRC-3 (AIB1/RAC3/ACTR/TRAM1/pCIP) (Han et al., 2009). Μόλις συνδεθούν οι συνενεργοποιητές, στρατολογούν την ρυθμιστική πρωτεΐνη p300 / CBP (πρωτεΐνη δέσμευσης CREB). Το σύμπλοκο αυτό επάγει τη μεταγραφή



αναδιαμορφώνοντας την χρωματίνη (μέσω της ικανότητας ακετυλίωσης των ιστονών) και αλληλεπιδρώντας με τη βασική μηχανή μεταγραφής (Lu & Danielsen, 1998). Έτσι, πιθανή αλληλεπίδραση ιόντων με την περιοχή AF-1, μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφική ενεργότητα του ERα και με αυτόν τον τρόπο. Ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ασαφής.

### **1.8.5 Άλατα αργιλίου – Υδροξυ-χλωριούχο αργίλιο (Aluminum Chlorohydrate, ACH)**

Το αργίλιο είναι το πιο άφθονο μέταλλο που βρίσκεται στο φλοιό της Γης. Το μέταλλο αυτό, χρησιμοποιείται για την κάθαρση του νερού και στη φαρμακοποιία εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Το θειϊκό αργίλιο χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα μέσω κροκίδωσης στον καθαρισμό του νερού, ενώ τα άλατα του αργιλίου χρησιμοποιούνται σε φάρμακα όπως τα αντιόξινα και την ασπιρίνη. Έχει αποδειχθεί ότι τα ανόργανα οξέα της όξινης βροχής (θειϊκά και νιτρικά κυρίως) μπορούν να διαλυτοποιήσουν το αργίλιο του εδάφους, εισάγοντάς το έτσι στα οικοσυστήματα. Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι το αργίλιο (και οι ενώσεις αργιλίου) είναι ακίνδυνες για το περιβάλλον και τους οργανισμούς, διότι τα άλατα αργιλίου σχηματίζουν μονομερικές υδροξυ-ενώσεις στα διαλύματα, οι οποίες γίνονται πολυμερείς και κολλώδη συσσωματώματα με τη πάροδο του χρόνου, οπότε λόγω αυτών των αδιάλυτων μορφών, η απορρόφηση του αργιλίου θα ήταν περιορισμένη, καθιστώντας το αβλαβές. Ωστόσο, το αργίλιο έχει αποδειχθεί ότι είναι τοξικό τόσο στα φυτά (Jones & Kochian, 1997) όσο και στα ζώα. Στον άνθρωπο, το αργίλιο παίζει ρόλο στην εγκεφαλοπάθεια, στην οστεομαλακία και στη μικροκυτταρική αναιμία. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν προτείνει μια πιθανή σχέση μεταξύ της νευροτοξικότητας του αργιλίου και της νόσου Alzheimer (AD) (Campbell & Bondy, 2000).

### **1.8.6 Πηγές έκθεσης στο αργίλιο**

Κύρια πηγή πρόσληψης αλουμινίου, για τον άνθρωπο, αποτελεί η τροφή, καθώς ενώσεις αργιλίου εμπεριέχονται σε χρωστικές τροφίμων, διογκωτικούς παράγοντες και σε συντηρητικά (Soni et al., 2001). Δεδομένη πρέπει να θεωρείται και η παρουσία του αργιλίου στο πόσιμο νερό, καθώς κατά την επεξεργασία του νερού αυξάνεται η περιεκτικότητα σε χαμηλού μοριακού βάρους, χημικά ενεργές και πιθανόν πιο εύκολα απορροφούμενες ενώσεις

αργιλίου (Soni et al., 2001). Επίσης, ενώσεις αργιλίου χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην βιομηχανία, σε αντιδρωτικά (που περιέχουν ACH), σε αντιόξινα και στο σύνολο των παρεντερικών διατροφικών διαλυμάτων. Όλες αυτές οι πηγές μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντική αύξηση της έκθεσης των οργανισμών στις ενώσεις αργιλίου (Soni et al., 2001).

### 1.8.7 Χημικές ιδιότητες αργιλίου

Στα πιο πολλά φυσικά συστήματα, το αργίλιο σπάνια συναντάται σαν ιόν ( $Al^{3+}$ ). Έτσι, η τοξικοκινητική του αργιλίου εξαρτάται από τις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες των διαφόρων συμπλόκων του (Harris et al., 1996). Σε βιολογικά συστήματα, τα τρισθενή κατιόντα αργιλίου σχηματίζουν εκτεταμένα σύμπλοκα με διάφορους προσδέτες (Becaria et al., 2002). Η υδατική χημεία του αργιλίου είναι αρκετά πολύπλοκη, επειδή το ελεύθερο  $Al^{3+}$  υδρολύεται και σχηματίζει ένα ευρύ φάσμα συμπλόκων με το νερό. Στα βιολογικά συστήματα, λοιπόν, συναντάμε τρεις κύριες μορφές ενώσεων του αργιλίου: τις μονομερείς, τις πολυμερείς (που σχηματίζονται μέσω αποπρωτονιομένων ομάδων  $OH$ , οι οποίες "γεφυρώνονται" μεταξύ των μεταλλικών κέντρων) και τα σύμπλοκα πολλαπλών πυρήνων αργιλίου (Becaria et al., 2002). Σε ουδέτερο pH, το αλάτι υφίσταται εκτεταμένη υδρόλυση και παράγεται  $Al(OH)_3$ . Καθώς το διάλυμα παλαιώνει, σχηματίζεται  $Al(OH)_4$ , το οποίο οδηγεί σε καθίζηση του αργιλίου στο διάλυμα. Το pH ενός διαλύματος καθορίζει τις ενώσεις αργιλίου που θα προκύψουν και την πιθανή ύπαρξη ιονισμένων μορφών του (Corain et al., 1990). Δεδομένου ότι το αλουμίνιο είναι ένας ισχυρός δέκτης οξυγόνου, τείνει επίσης να δεσμεύεται από άλλους δότες οξυγόνου όπως τα κιτρικά άλατα, τα φωσφορικά άλατα, το γαλακτικό οξύ, το οξαλικό οξύ, το κιτρικό οξύ και τις κατεχολαμίνες (Harris et al., 1996).

### 1.8.8 Απορρόφηση αργιλίου

Η απορρόφηση του αργιλίου γίνεται από διάφορες οδούς, όπως η στοματική, ενδορινική, η διαδερμική και η παρεντερική (Yokel & McNamara, 2001). Στον άνθρωπο, η μεγαλύτερη ημερήσια πρόσληψη αργιλίου, γίνεται μέσω της έκθεσης στις ενώσεις αργιλίου που υπάρχουν στα τρόφιμα και στο νερό, χωρίς όμως να είναι γνωστό το ποσοστό πρόσληψης αργιλίου, καθώς η σύσταση και η οξύτητα των τροφίμων μεταβάλλουν τη διαθεσιμότητα του αργιλίου (Becaria et al., 2002). Η απορρόφηση του αργιλίου ευνοείται σε όξινα pH, πράγμα το οποίο

ενισχύει και την διαλυτότητα των ενώσεων αργιλίου. Η παρουσία μικρών οργανικών οξέων, όπως το κιτρικό και το γαλακτικό, οδηγούν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του αργιλίου, ενώ ο φωσφόρος και το πυρίτιο οδηγούν στη μείωση της απορρόφησής του (Yokel & O'Callaghan, 1998). Ο μηχανισμός, με τον οποίο τα οργανικά οξέα επάγουν την πρόσληψη αργιλίου, πιθανόν να εμπλέκει τον σχηματισμό ενός συμπλόκου αργιλίου / οργανικού οξέος. Αντίστοιχα, το κιτρικό άλας είναι γνωστό ότι αυξάνει τη γαστρεντερική απορρόφηση του αργιλίου, όχι λόγω σύνδεσής του με το αργίλιο (όπως στα οργανικά οξέα), αλλά λόγω της αύξησης της απορρόφησης μέσω ενός παρακεντρικού μηχανισμού, ανοίγοντας δηλαδή "σφιχτά" σημεία μεταξύ κυττάρων των βλεννογόνων (Taylor et al., 1998).

Το αργίλιο πιστεύεται ότι απορροφάται τόσο διακυτταρικά (κυτταρο-μεσολαβούμενη ενδοκύτωση, απλή διάχυση ή διάχυση μέσω διαύλων ιόντων), όσο και παρακεντρικά (μεταξύ παρακείμενων κυττάρων) από το εξωτερικό περιβάλλον (Exley et al., 1996). Η ζελατινώδης βλέννα στην γαστρεντερική οδό μπορεί να αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή στην απορρόφηση του αργιλίου (Powell et al., 1999). Επίσης, το αργίλιο μπορεί να εισέλθει στον εγκέφαλο μέσω των οσφρητικών νευρώνων που βρίσκονται στην οροφή της ρινικής κοιλότητας, η οποία προβάλλει στον οσφρητικό βολβό και μέσα από μια σειρά σύνθετων νευρωνικών δικτύων, νευρικά κύτταρα προβάλλουν στον οσφρητικό φλοιό στο φλοιό του εγκεφάλου και στον ιππόκαμπο. Αυτές, βέβαια, είναι και οι περιοχές που επηρεάζονται περισσότερο και από τη νόσο Alzheimer (Becaria et al., 2002). Επίσης, η διαδερμική απορρόφηση του αργιλίου αναφέρθηκε μετά από μια εφαρμογή συμασμένου aluminum chlorohydrate (υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου), σε ποντίκια, με το συνολικό ποσοστό απορρόφησης να είναι το 0,012% της αρχικής ποσότητας που εφαρμόστηκε και να εντοπίζεται σε υψηλή περιεκτικότητα τόσο στον εγκέφαλο όσο και στον ορό (Flarend et al., 2001). Το γεγονός ότι τα ποντίκια ήταν ζυρισμένα πριν από την εφαρμογή του υδατικού διαλύματος χλωριούχου αργιλίου μπορεί να ενισχύει τη συστηματική απορρόφηση του αργιλίου. Παρόλα αυτά, το αργίλιο που περιέχουν τα αντιδρωτικά, ειδικά εάν εφαρμόζεται στο δέρμα μετά από ξύρισμα, μπορεί πολύ εύκολα να εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία (Becaria et al., 2002).

### 1.8.9 Κατανομή αργιλίου

Η χημεία του αργιλίου είναι παρόμοια με εκείνη του σιδήρου και το μέταλλο μεταφέρεται κυρίως στους ιστούς από την τρανσφερίνη που δεσμεύει το σίδηρο. Το 90% του συνολικού αργιλίου είναι δεσμευμένο σε αυτή την πρωτεΐνη μεταφοράς και επειδή είναι μόνο εν μέρει κορεσμένο, όλο το αργίλιο που βρίσκεται στον ορό είναι δεσμευμένο πάνω στην

τρανσφερίνη (Becaria et al., 2002). Ο κύριος μηχανισμός, με τον οποίο το αργίλιο εισέρχεται στα κύτταρα είναι μέσω της εξαρτώμενης από τον υποδοχέα της τρανσφερίνης ενδοκύτωσης (Shi & Haug, 1990). Αντίθετα, το 10% του αργιλίου που δεν δεσμεύεται στην τρανσφερίνη αλληλεπιδρά με χαμηλής μοριακής μάζας βιοενώσεις του αργιλίου. Το σύμπλοκο αργιλίου-κιτρικού είναι η "κυρίαρχη" ένωση που συναντάμε στον ορό των ανθρώπων (Becaria et al., 2002).

Η ενδοφλέβια έκθεση σε αργίλιο από τα προϊόντα διάλυσης, συνολική παρεντερική διατροφή, εμφύλια και ανοσοθεραπεία αποτελούν σημαντική πηγή απορρόφησης του αργιλίου (Flarend et al., 2001). Η κατανομή του αργιλίου στους ιστούς αρουραίων που θανατώθηκαν τρεις εβδομάδες μετά από μία μόνο ενδοφλέβια ένεση 26AI, βρέθηκε να είναι 0,9% εντός των οστών, 0,2% στους νεφρούς, 0,06% στο ήπαρ, 0,03% στην καρδιά και 0,02% στον εγκέφαλο και στους μύες (Walker et al., 1994).

Ο εγκέφαλος είναι ένα σημαντικό όργανο-στόχος του αργιλίου, καθώς το μέταλλο είναι ικανό να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier-BBB). Ο χρόνος ημιζωής του αργιλίου στον ανθρώπινο εγκέφαλο υπολογίζεται στα επτά χρόνια (Yokel & McNamara, 2001). Αν και είναι απίθανο τα σύμπλοκα αργιλίου-πρωτεϊνών να διαπερνούν άμεσα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (λόγω του μεγάλου τους μεγέθους), ένας πιθανός μηχανισμός είναι η εξαρτώμενη από τον υποδοχέα της τρανσφερίνης ενδοκύτωση (Yokel, 2002). Οι υποδοχείς της τρανσφερίνης είναι παρόντες στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών του εγκεφάλου, στα επιθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος, στους νευρώνες και στα γλοιακά κύτταρα (Moos & Morgan, 2000). Άλλοι μηχανισμοί εισόδου του αργιλίου στον εγκέφαλο μπορεί να είναι μη ειδικές διεργασίες, όπως η διάχυση ή η πινοκύτωση (pinocytosis) μικρών μορίων δεσμευμένα στο μέταλλο (DeVoto & Yokel, 1994). Τελικά, η συγκέντρωση, η βιοχημική μορφή και ο εντοπισμός του μετάλλου είναι οι καθοριστικοί παράγοντες της τοξικότητας του αργιλίου.

### 1.8.10 Απομάκρυνση αργιλίου

Δεδομένου ότι το αργίλιο σχηματίζει εξαιρετικά αδιάλυτες υδροξύ-ενώσεις, σε ουδέτερο pH, μια σημαντική ποσότητα αργιλίου απεκκρίνεται στα κόπρανα χωρίς ποτέ να απορροφηθεί. Μόλις όμως, το μέταλλο απορροφηθεί, εκκρίνεται είτε με τα ούρα είτε στη χολή. Το ήπαρ είναι μια σημαντική πρώιμη δίοδος για απορροφημένο αργίλιο και μια απλή δόση κιτρικού αργιλίου με καθετήρα εκκρίνεται γρήγορα από το χολικό σύστημα (Exley et al., 1996).

Γενικά, η οδός απέκκρισης του αργιλίου, εξαρτάται τόσο από την οδό χορήγησης όσο και από τη δόση του αργιλίου (Sutherland & Greger, 1998). Σε κανονικά επίπεδα έκθεσης στο αργίλιο, το χολικό σύστημα φαίνεται να είναι η κύρια οδός έκκριση, ενώ σε έκθεση περίπου 1 mmol αργιλίου, αυτό το σύστημα κορέγνυται και η νεφρική απέκκριση αρχίζει να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Έτσι, σε μια περίπτωση μεγάλης έκθεσης σε αργίλιο, η απέκκριση του μεγαλύτερου ποσοστού του αργιλίου γίνεται από τα ούρα. Περίπου το 90% της απέκκρισης του αργιλίου από τα νεφρά γίνεται 48 ώρες μετά την έκθεση του οργανισμού στο μέταλλο (Jouhanneau et al., 1993).

### 1.8.11 Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το αργίλιο

Το οξειδωτικό στρες είναι απόρροια από τον σχηματισμό δραστικών ενώσεων του οξυγόνου (ROS), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και τη ρίζα του οξυγόνου ( $_{1/2} O_2$ ). Οι ενώσεις αυτές παράγονται στο μιτοχόνδριο από την διαρροή ηλεκτρονίων από τα ένζυμα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Halliwell, 1992). Οι περισσότερες κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται από τα ROS, οφείλονται στη μετατροπή των ROS σε σχετικά βραχύβια αλλά εντόνως δραστικά ενδιάμεσα, όπως οι ρίζες υδροξυλίου ( $+ OH$ ), οι οποίες μπορούν να καταστρέψουν το DNA, καθώς και κυτοσολικά και μεμβρανικά μακρομόρια (Becaria et al., 2002).

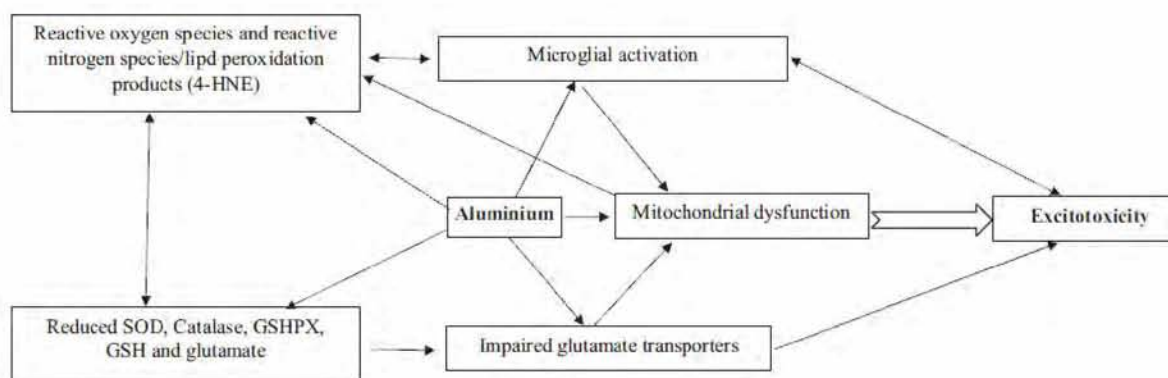
Οξειδωτικά γεγονότα έχουν συσχετιστεί άμεσα με νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως τη νόσο Alzheimer, χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί εάν είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της νόσου (Hensley et al., 1996; Nunomura et al., 1999). Η ερευνητική ομάδα του Smith, καθιέρωσε περαιτέρω τη σύνδεση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των ενώσεων του γερασμένου εγκεφάλου, με την παρουσίαση της 4-υδροξυνονεόλης και του αντιοξειδωτικού ενζύμου της αίμης οξυγενάση-I, να βρίσκονται όλα στην περιφέρεια των αμυλοειδών πλακών. Έτσι, γεγονότα που αυξάνουν την χρόνια παραγωγή αυτών των δραστικών ενδιάμεσων μπορούν να οδηγήσουν στη μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας και επομένως θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα των κυττάρων. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος μειώνεται σε ασθενείς με AD, ενώ η δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου χαλκού-ψευδαργύρου στα ερυθροκύτταρα και τα επίπεδα mRNA της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου των λεμφοκυττάρων αυξάνονται σημαντικά, ίσως λόγω αντισταθμιστικών μηχανισμών (Becaria et al., 2002). Η δραστηριότητα της καταλάσης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου μειώνεται στον εγκέφαλο ασθενών με AD, μαζί με μια αύξηση στην οξείδωση των λιπιδίων (Marcus et al., 1998) και έχει προταθεί ότι μέταλλα χωρίς οξειδοαναγωγική

ικανότητα όπως το αργίλιο, μπορούν να καταστήσουν τα λιπαρά οξέα πιο ευάλωτα στις ελεύθερες ρίζες, προάγοντας έτσι την οξειδωση των λιπιδίων (Ohyashiki et al., 1998).

Το αργίλιο μπορεί να επάγει την παραγωγή ROS μέσω του σιδήρου (Bondy & Kirshtein, 1996) και του χαλκού (Bondy et al., 1998). Τα ιόντα χαλκού και σιδήρου, τα οποία υπάρχουν στα περισσότερα κυτταρικά διαμερίσματα, είναι γνωστό ότι είναι προ-οξειδωτικά μέταλλα και το αργίλιο ενισχύει την ικανότητα αυτών των μεταβατικών μετάλλων στην παραγωγή οξειδωτικού στρες, καθώς το κολλοειδές αργίλιο μπορεί να δεσμεύει αυτά τα μέταλλα και να τους αλλάζει την ικανότητα παραγωγής οξειδωτικού στρες (Campbell et al., 2001). Αυτό το γεγονός μπορεί να δώσει περαιτέρω ώθηση στην υπόθεση ότι τα κολλοειδή (περιλαμβανομένου του συσσωματώματος β-αμυλοειδών πεπτιδίων) μπορούν να συμπλοκοποιούνται με προ-οξειδωτικά μέταλλα, και έτσι να τους επιτρέψει να συμμετάσχουν στις αντιδράσεις του Fenton για ένα περισσότερο χρονικό διάστημα (κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων Fenton παράγονται ROS και σχηματίζεται  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Yang et al., 1999).

Η επεξεργασία με αργίλιο μπορεί να επάγει τον σχηματισμό ROS τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η παροχή ενέσιμου γλυκονικού αργιλίου αύξησε τα επίπεδα των ROS στον φλοιώδη ιστό σε ποντίκια και στον εγκέφαλο αρουραίων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με γαλακτικό αργίλιο, για τέσσερις εβδομάδες, έδειξε αύξηση της λιπιδιακής οξειδωσης (Bondy et al., 1998) και σημαντική μείωση των αντιοξειδωτικών ενώσεων (Julka & Gill, 1996). Έκθεση των κυττάρων σε θειικό αργίλιο αύξησε τον σχηματισμό των ROS, συνοδευόμενο από αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και μείωση της γλουταθειόνης, σε νευρογλοιακές αλλά όχι νευρωνικές κυτταρικές σειρές (Campbell et al., 1999).

Η ικανότητα του αργιλίου να προάγει την περιφερική φλεγμονή είναι αδιαμφισβήτητη. Οι ενώσεις αργιλίου έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, καθώς μπορούν να ενεργοποιήσουν το συμπλήρωμα, να επάγουν τα ηωσινόφιλα και να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα (Gupta, 1998). Σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με εμβόλια που περιείχαν υδροξύλιο του αργιλίου, αναφέρθηκε εκτεταμένη φλεγμονή. Επίσης, η χορήγηση ανοσοενισχυτικού φωσφορικού αργιλίου προκαλεί επαγωγή στη μεταγραφή φλεγμονωδών δεικτών, όπως της υπομονάδας γάμμα του υποδοχέα IL-2, του c-jun και του c-fos σε λεμφοειδή όργανα (Regnstrom et al., 2002).

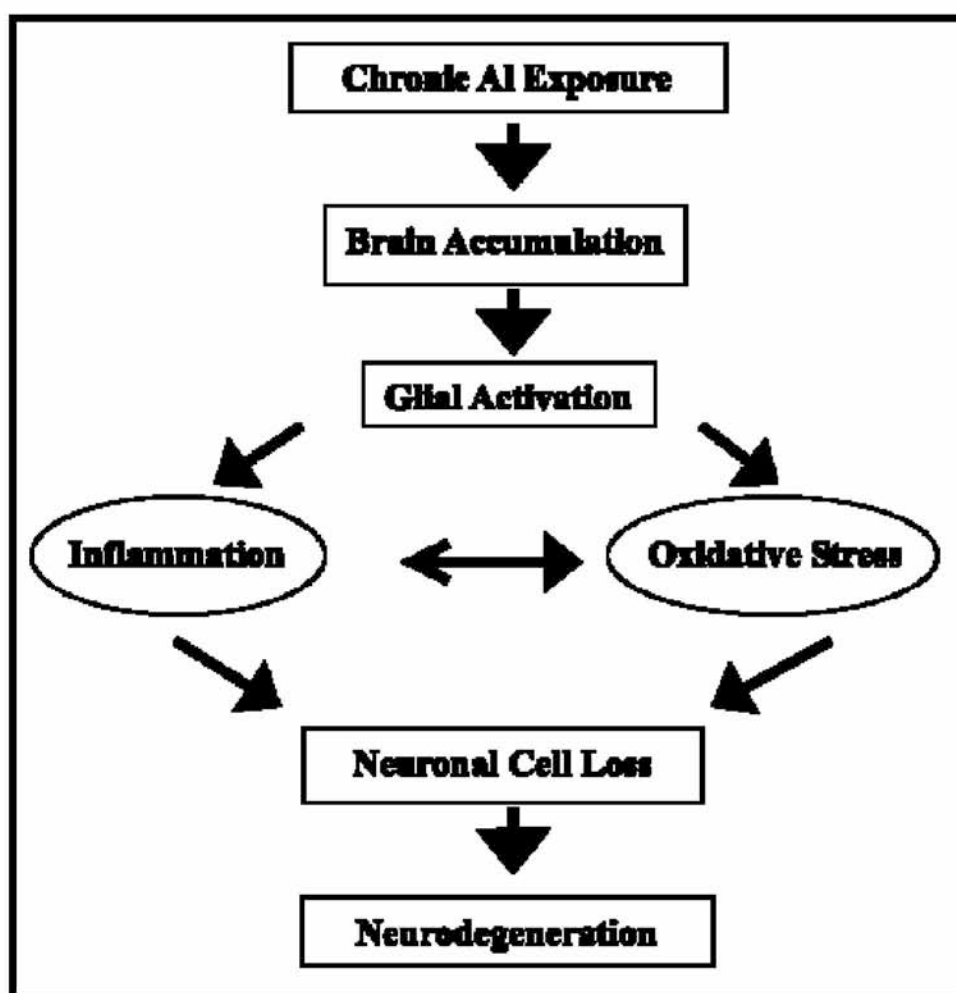


**Εικόνα 16.** Διαγραμματική αναπαράσταση των πιθανών μηχανισμών, με τους οποίους το αργίλιο προκαλεί νευροτοξικότητα. Κυριότεροι παράγοντες είναι η παραγωγή ROS και η επακόλουθη περοξειδωση των λιπιδίων, η ελάττωση των επιπέδων της καταλάσης, της GSH και της SOD καθώς και η ευρύτερη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Maya et al. 2016).

Επίσης, έχει αναφερθεί η ικανότητα του αργιλίου να επάγει φλεγμονώδεις αντιδράσεις στον εγκέφαλο, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, που έγινε σε νευρικές καρκινικές σειρές που εκτέθηκαν σε αργίλιο για 72 ώρες, έδειξαν αύξηση του TNF-α και της φλεγμονώδους πρωτεΐνης άλφα των μακροφάγων (macrophage inflammatory protein-1 alpha -MIP-1a) (Johnson & Sharma, 2003). Σε γλοιώδη κύτταρα, η χορήγηση αργιλίου για τρεις ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης του TNF-α μαζί με την ενεργοποίηση του ανοσολογικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Becaria et al., 2002). Η χρόνια έκθεση κουνελιών σε γαλακτικό αργίλιο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Yokel & O'Callaghan, 1998), ενώ ενέσιμη χορήγηση μαλτοειδούς αργιλίου, επίσης, σε κουνέλια οδήγησε στην ενεργοποίηση του NF-κB (Ghribi et al., 2001). Γενικά έχει αποδειχθεί ότι οι ενώσεις αργιλίου μπορούν να ενεργοποιήσουν τόσο τον NF-κB, όσο και τον παράγοντα υποξείας (hypoxia factor 1-HIF1) και τον ρυθμιστικό παράγοντα ιντερφερόνης-1. Τελικά, έχει αποδειχτεί ότι το αργίλιο μπορεί να επάγει την φλεγμονή, μέσω διαφορετικών οδών, ανάλογα με το είδος της ένωσης αργιλίου αλλά και την έκθεση του οργανισμού σε αυτήν. Αυτή του η δράση, σε συνδυασμό με την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, καθιστούν το αργίλιο "ένοχο" για διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Becaria et al., 2002).

Το αργίλιο έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει ένα σύνολο σημαντικών μεταβολικών διεργασιών, κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως: τη σύνθεση νευροδιαβιβαστών, τη φωσφορυλίωση μεταβιβαστών, την φωσφορυλίωση και την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων καθώς και την φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (Maya et al., 2016). Επειδή το αργίλιο παρουσιάζει μόνο μια οξειδωμένη μορφή ( $\text{Al}^{3+}$ ), η οποία έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αρνητικά φορτισμένους προσδέτες, δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς

με οργανικά και μη οργανικά φωσφορικά και καρβοξυλικά άλατα, καθώς και με αποπρωτονιομένες υδροξυλικές ομάδες (Maya et al., 2016). Αυτά τα χαρακτηριστικά του αργιλίου, του επιτρέπουν να δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς με φωσφορικές ομάδες του DNA και του RNA, επηρεάζοντας την τοπολογία του DNA και την έκφραση γονιδίων (Maya et al., 2016). Επίσης, το αργίλιο προσδένεται σε φωσφορικές ομάδες δι- και τριφωσφορικών ενώσεων, όπως το ATP, επηρεάζοντας έτσι τον ενεργειακό μεταβολισμό. Επίσης, επειδή το αργίλιο έχει ισχυρό θετικό φορτίο και μικρή ακτίνα ιονισμού σε σχέση με το ασβέστιο, το νάτριο και τον ψευδάργυρο, μπορεί να προσδεθεί ισχυρά σε μεταλλο-συνδεδεμένα αμινοξέα (όπως η ιστιδίνη, η τυροσίνη και η αργινίνη) ή σε φωσφοριλυωμένα αμινοξέα (Maya et al., 2016). Τέλος, αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τον ολιγομερισμό των πρωτεϊνών, επηρεάζοντας μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες αναστέλλουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αυτών από τις πρωτεάσες (Kawahara & Kato-Negishi, 2011).



**Εικόνα 17.** Η χρόνια έκθεση στο αργίλιο οδηγεί στη συσσώρευση αυτού, στον εγκέφαλο. Συνέπεια αυτού είναι η ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια παράγουν κυτοκίνες αλλά και ROS σαν αντίδραση σε ένα ερέθισμα, το οποίο τα κύτταρα αντιλαμβάνονται ως παθογόνο. Παρατεταμένη έκκριση αυτών των παραγόντων μπορεί να μειώσει τους νευροπροστατευτικούς



μηχανισμούς, όπως την αντιοξειδωτική άμυνα, οδηγώντας έτσι σε απώλεια νευρωνικών κυττάρων και τελικά σε νευροεκφυλισμό (Becaria et al. 2002).

Πιο ειδικά, το αργίλιο, επηρεάζει την έκφραση γονιδίων μεταβάλλοντας την έκφραση πρωτεασών και δεσμευόμενο στο σύμπλοκο DNA-ιστονών, επάγοντας τις τοπολογικές αλλαγές στο DNA (Lukiw et al., 1987). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο νευρικό σύστημα, το αργίλιο μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα του TNF-α και της GFAP, καθώς επίσης επάγει και την έκφραση του NF-κΒ, της ιντερλευκίνης 1β και της φωσφολιπάσης A2, μόρια τα οποία εμπλέκονται σε προαποπτωτικούς και προφλεγμονώδεις μηχανισμούς (Maya et al., 2016; Nedzvetsky et al., 2006). Επίσης, η έκθεση σε αργίλιο οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του νευρικού αυξητικού παράγοντα (neuron growth factor-NGF) και του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (brain derived neurotrophic factor-BDNF), πιθανόν μέσω πρόσδεσης του αργιλίου στον δακτύλιο ψευδαργύρου του μεταγραφικού παράγοντα IIIA (Johnson & Sharma, 2003). Άλλες, μελέτες δείχνουν την ικανότητα του αργιλίου, σε μικρές συγκεντρώσεις, να ξετυλίγει το υπερελικωμένο DNA μη αναστρέψιμα, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις, μπορεί να μειώνει τον ρυθμό της αντιγραφής του DNA (Rao et al., 1993).

Επίσης, το αργίλιο μπορεί να μεταβάλλει την ομοιόσταση του ασβεστίου. Το αργίλιο επάγει το κλείσιμο τασεο-εξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου, παρεμποδίζοντας την καλμοδουλινο(CaM)-εξαρτώμενη  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPάση, η οποία έχει προστατευτική-αντιτοξική δράση (Exley, 1999). Το αργίλιο μπορεί να επηρεάσει την ομοιόσταση του ασβεστίου, καθώς μπορεί να επιβραδύνει τη μετακίνηση του ασβεστίου από το κυτταρόπλασμα, μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει το αργίλιο με την αναστολή της υδρόλυσης της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP2) από την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλ-ειδική φωσφολιπάση C (PI-PLC), γεγονός το οποίο οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3), μειωμένη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και τελικά επιβράδυνση της μετακίνησης ασβεστίου από το κυτταρόπλασμα (Walton, 2012).

Επίσης, στο νευρικό σύστημα (και πιο συγκεκριμένα σε αστροκύτταρα και σε γλοιικά κύτταρα), το αργίλιο μπορεί να επάγει την απόπτωση, καθώς επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια, μειώνει την πρωτεΐνη Bcl-2 τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, επάγει την μετακίνηση της πρωτεΐνης Bax προς τα μιτοχόνδρια, ενεργοποιεί την κασπάση 3 και προωθεί τον κατακερματισμό του DNA (Maya et al., 2016). Το κυτόχρωμα C που απελευθερώθηκε από τα μιτοχόνδρια, προσδένεται στην πρωτεΐνη Araf-1, ενισχύοντας τον αργίλιο-εξαρτώμενο αποπτωτικό καταρράκτη (Savory, Herman, & Ghribi, 2003). Το τελευταίο σύμπλοκο ενεργοποιεί την κασπάση 9, η οποία ενεργοποιεί με τη σειρά της, υπό συνθήκες, την κασπάση 3 (Maya et al., 2016). Επίσης,

μελέτες δείχνουν την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/ c-jun N-terminal kinase) από το αργίλιο, με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (Maroney et al., 1998). Γενικά, η χορήγηση αργιλίου, έχει ως αποτέλεσμα κάποια χαρακτηριστικά της απόπτωσης, όπως τη συρρίκνωση του κυττάρου, την υπερσυμπύκνωση και το ακανόνιστο σχήμα της χρωματίνης και τον εκτεταμένο κατακερματισμό του DNA.

Τέλος, το αργίλιο μπορεί να προκαλέσει νευροϊνδιακά πλέγματα (neurofibrillary tangles-NTFs), τα οποία είναι το σύνολο των πρωτεϊνών tau και αποτελούν δείκτες νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως της νόσου Alzheimer και της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (Maya et al., 2016). Μελέτες δείχνουν ότι το αργίλιο μπορεί να δημιουργήσει ανωμαλίες στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως τις tau, προκαλώντας έτσι τον σχηματισμό νευροϊνδιακών πλεγμάτων (Maya et al., 2016). Οι tau δεσμεύονται στους υγίης νευρώνες, μέσω των μικροσωλινίσκων και είναι απαραίτητοι για τον σχηματισμό και τη λειτουργία του νευρονικού κυτταροσκελετού (Maya et al., 2016). Το αργίλιο επάγει την υπερφωσφορυλίωση των tau, αναστέλλοντας την ενεργότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης-2A (protein phosphatase-2A-PP2A) (Walton, 2010). Επίσης, το αργίλιο ενεργοποιεί κασπάσες, οι οποίες πρωτεολύουν τις υπερφωσφορυλιωμένες tau (Walton, 2010). Το αργίλιο έτσι προσδένεται σε αυτές τις τροποποιημένες tau και τις συσσωρεύει σε κοκκίδια, τα οποία όταν υπερσυσσωρευθούν εμφανίζονται σαν κυτταροπλασματικές δεξαμενές, επάγοντας τον πολυμερισμό των νευροϊνδιακών πλεγμάτων (αποτελώντας τον πυρήνα) (Walton, 2010). Μερικά NTFs γίνονται τόσο μεγάλα που μπορούν να λύσουν νευρικά κύτταρα.

## 1.9 Σκοπός

Τα οιστρογόνα, μέσω της πρόσδεσής τους στους υποδοχείς των οιστρογόνων, ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Επίσης, η ύπαρξη διαφόρων ισομορφών των υποδοχέων των οιστρογόνων, η ύπαρξη πολλών (φυσικών ή τεχνητών) προσδετών των υποδοχέων, η ευρεία υποκυτταρική εντόπιση των υποδοχέων, αλλά και η διαφορική κατανομή τους στους ιστούς καθιστούν τους υποδοχείς των οιστρογόνων σημαντικούς παράγοντες ρύθμισης της φυσιολογίας των κυττάρων και του οργανισμού γενικότερα. Επιπλέον, παρέκκλιση από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ρύθμισης της δράσης των οιστρογόνων οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Κατά συνέπεια, η διερεύνηση και η πλήρης

αποσαφήνιση των μηχανισμών της οιστρογονικής σηματοδότησης παίζουν καίριο ρόλο στην κατανόηση της επίδρασης των οιστρογόνων στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών.

Μεταξύ των παραγόντων που παρεμβάλλονται στην οιστρογονική σηματοδότηση είναι τα ξενοοιστρογόνα. Μια υποκατηγορία των ξενοοιστρογόνων αποτελούν τα μεταλλοοιστρογόνα, τα οποία ασκούν τη βιολογική τους δράση μέσω και της αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς των οιστρογόνων, παρεμβαίνοντας στην ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών διεργασιών. Η ευρεία χρήση των μεταλλοοιστρογόνων, η καθημερινή έκθεση των οργανισμών σε αυτά αλλά και οι βιβλιογραφικές αναφορές της εκτεταμένης εμπλοκής τους σε πολλές ασθένειες οδήγησαν στην συστηματική μελέτη τους. Οι ενώσεις του αργιλίου έχουν χαρακτηριστεί ως, εν δυνάμει, μεταλλοοιστρογόνα. Έτσι, σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί η διερεύνηση της πιθανής παρεμβολής των ενώσεων του αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση καρκινικών κυττάρων μαστού και νευροβλαστωματικών κυττάρων, καθώς και ο χαρακτηρισμός των μηχανισμών, με τους οποίους επιτελείται αυτή η δράση.

Δεδομένου μάλιστα του σημαντικού ρόλου των μιτοχονδρίων στη δημιουργία και στην εξέλιξη αυτών των παθολογικών καταστάσεων, καθώς και της εντόπισης των υποδοχέων των οιστρογόνων, ιδιαίτερα της βήτα μορφής, σε διαφόρους τύπους κυττάρων, η διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού ERβ αποτέλεσε επίσης στόχο της παρούσας διατριβής.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

Διάλυμα	Σύσταση – Παρασκευή
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1×	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% v/v SDS διαλυμένων σε ddH <sub>2</sub> O. Διατήρηση σε R.T
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1×	10% v/v Running Buffer 10×, 20% v/v μεθανόλη και 0,05% v/v SDS. Συμπλήρωση όγκου με ddH <sub>2</sub> O. Αποθήκευση στους 4 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×	91 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> και 1500 mM NaCl. Αποθήκευση σε R.T
Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×	Αραίωση του stock buffer PBS 10× σε ddH <sub>2</sub> O ή ddH <sub>2</sub> O. Προσθήκη Tween-20 1% v/v. Διατήρηση σε R.T
Διαλύματα για εμφάνιση σήματος	Χρήση δύο εμπορικών σκευασμάτων της Kodak, ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Παρασκευή με ανάμειξη 1:3,5 από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε ddH <sub>2</sub> O
Loading Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης DNA σε πηκτή αгарόζης)	0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% w/v xylene cyanol, 30% v/v γλυκερόλη όπου διαλύονται σε ddH <sub>2</sub> O. Αποθηκεύεται στους 4 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA-stock (TAE 50×	Για 1L: 242,2 g Tris σε 600 ml ddH <sub>2</sub> O, αργή προσθήκη 57,1 ml υγρού οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M, pH =8. Συμπλήρωση με ddH <sub>2</sub> O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Τελικές συγκεντρώσεις του χρησιμοποιούμενου TAE 1x: 0.04 M Tris - Acetate, 0.001 M EDTA
RIPA Buffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% v/v NP-40 και 0,25% v/v Na-deoxycholate. Αποθήκευση στους 4°C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
Sample Buffer 4× (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών σε πηκτή ακρυλαμίδης)	1 M Tris-HCl pH =6.8, 10% v/v γλυκερόλη, 10% v/v SDS, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % v/v κυανού της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20 °C

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10x	0,2 M Tris base και 1,5 M NaCl, ρύθμιση pH =7,2 έως 7,4 με πυκνό διάλυμα HCl
Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x	Αραίωση του stock buffer TBS 10x σε ddH <sub>2</sub> O ή ddH <sub>2</sub> O. Προσθήκη Tween-20 1% v/v. Διατήρηση σε R.T
PMSF 200 mM	Με αραίωση 10 % v/v σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 200 mM
Polyvinyl-Alcohol (PVA)	Θέρμανση 75ml διπλά αποσταγμένου H <sub>2</sub> O στους 80°C και προσθήκη 5ml διαλύματος Tris-PO <sub>4</sub> , pH=9. Διαλύονται 100mg χλώροβουτανόλης. Το διάλυμα αναδεύεται συνεχώς με μαγνητάκι και σε αυτό προστίθενται σταδιακά 20 g PVA. Η προσθήκη PVA γίνεται αργά προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Όταν το διάλυμα γίνει παχύρευστο, αλλά χωρίς συσσωματώματα, προστίθενται 50 μl phenol red (βρίσκεται σε διάλυμα 1% v/v αιθανόλης). Το διάλυμα χρωματίζεται κόκκινο-μπορντό. Στη συνέχεια προστίθενται 20 ml γλυκερόλης (87% v/v) υπό ανάδευση. Το διάλυμα απομακρύνεται από την θέρμανση και την ανάδευση και αφήνεται έως ότου κρυώσει. Τέλος χωρίζεται σε aliquots των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C

**Πίνακας 1.** Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco®	D-Γλυκόζη	L-γλουταμίνη	Πυροσταφυλικό	Ερυθρό της Φαινόλης	Εμβρυικός βόειος ορός (FBS)	Πενικιλίνη / Στρεπτομυκίνη
DMEM high glucose	4,5g/L	+	+	+	FBS	+
DMEM low glucose	1g/L	+	+	+	FBS	+
DMEM high glucose (cis)	4,5g/L	+	-	-	FBS cis (απενεργό ποιημένος)	+

<b>DMEM low glucose (cis)</b>	1g/L	+	-	-	ορός) FBS cis + (απενεργοποιημένος ορός)
<b>OptiMEM</b>	-	-	-	-	-

**Πίνακας 2.** Θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή. Οι κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231 και HEK293 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (4,5 g/L), ενώ οι κυτταρικές σειρές N2A και SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με χαμηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη (1 g/L).

Όνομα κυτταρικής σειράς	Οργανισμός	Ιστός	Τύπος κυττάρων	Ασθένεια
<b>MCF-7</b>	Homo sapiens, human	Μαστικός αδένας: προέρχεται από μεταστατικό όγκο	Επιθηλιακά	Αδενοκαρκίνωμα
<b>MDA-MB-231</b>	Homo sapiens, human	Μαστικός αδένας: προέρχεται από μεταστατικό όγκο	Επιθηλιακά	Αδενοκαρκίνωμα
<b>HEK293</b>	Homo sapiens, human	Εμβριονικός νεφρός	Εμβριονικά	-
<b>N2A</b>	Mus musculus, mouse	Εγκέφαλος	Νευροβλάστες	Νευροβλάστωμα
<b>SH-SY5Y</b>	Homo sapiens, human	Μυελός των οστών	Επιθηλιακά	Νευροβλάστωμα

**Πίνακας 3.** Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή

Αντίσωμα	Εταιρία	Πηγή	kDa	Κωδικός
α-tubulin	Santa Cruz	Rabbit	55	SC-9104
β-actin	Sigma	Mouse	45	-
Bax	Cell Signaling	Rabbit	20	2772
BCL-xL	Cell Signaling	Rabbit	30	2762
Bcl-2	Cell Signaling	Rabbit	28	2876
Casp.3	Cell Signaling	Rabbit	17, 35	9662
Casp.9	Cell Signaling	Mouse	47, 35	9508
c-Myc	Cell Signaling	Rabbit	57-65	5605
ERα	Santa Cruz	Rabbit	66	G20

ER $\alpha$	Santa Cruz	Mouse	66	D-12
pER $\alpha$	Santa Cruz	Mouse	67	16J4
ER $\alpha$	Santa Cruz	Mouse	66	F-10
ER $\beta$	Santa Cruz	Rabbit	65	H150
ER $\beta$	Santa Cruz	Mouse	65	B-1
GFP	Roche	Mouse	27	-
ER $\beta$	Serotec	Mouse	65	MCA
PEPCK	Santa Cruz	Rabbit	64	H300
TRX-2	Karolinska Institutet	Mouse	25	Homemade
P53	Dako	Mouse	53	-
SDH	Invitrogen	Mouse	72	-

**Πίνακας 4Α.** Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή

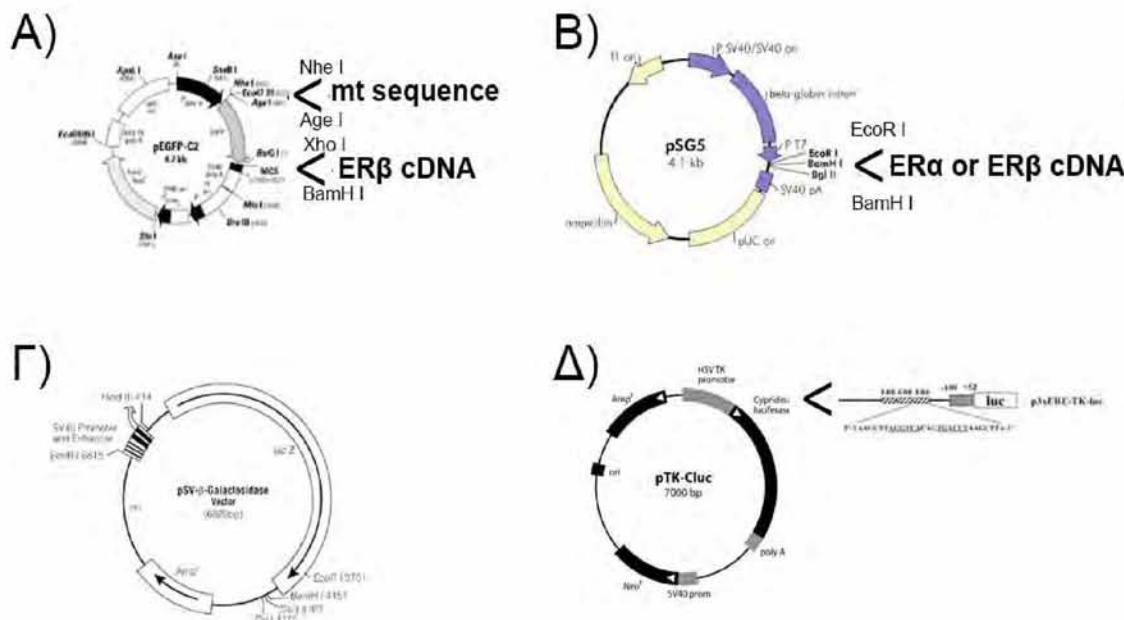
Δεύτερα Αντισώματα	Εταιρία
Rabbit IgG-HRP	Pierce Antibodies-Thermo Fisher Scientific
Mouse IgG-HRP	Pierce Antibodies-Thermo Fisher Scientific
Rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen-Thermo Fisher Scientific
Mouse IgG-Alexa Fluor 555	Invitrogen-Thermo Fisher Scientific

**Πίνακας 4Β.** Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή

Γονίδιο	Αλληλουχία	Εταιρία
$\beta$ -actin	R: CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT F: GGAGCAATGATCTTGATCTT	Invitrogen
Cytochrome b	F: TTATCGCGGCCCTAGCAA R: TAATCCTGTTGGGTTGTTTGATCC	Invitrogen
ATP 6	F: AATTACAGGCTTCCGACACAAAC R: TGGAATTAGTGAAATTGGAGTTCCT	Invitrogen
Cyclin D1	F: GTGGCCTCTAAGATGAAGGAGA R: GCATTTTGGAGAGGAAGTGTTT	Invitrogen
c-fos	F: GCTTCAACGCAGACTACGAG R: AGTGACCGTGGGAATGAAGT	Invitrogen
COX I	F: GAAGAGACAGTGTTCATGTGGTGT R: TCCTGGGCCTTTCAGGAATA	Invitrogen
COX IV	F: CCATGTCACGATGCTGTCTG R: CTCCCAAATCAGAACGAGCG	Invitrogen
CRE 1-3	F: CAGGGCCATCAAATGCGTTA R: GTGATTGGGTTTTGCGGACT	Invitrogen
CRE 3	F: CAAGGCATGAAAGGACAGCA	Invitrogen

	R: GTGATTGGGTTTTGCGGACT	
ER $\beta$	F: GCATGACAGATTTCTACCACTCC R: AAGATGTAGAGCGGGCCTTT	Invitrogen
ERE-COXI	F: TGAGCGGGAATAGTGGGTAC R: GTCAGTTTCCAAAGCCTCAA	Invitrogen
ERE-D-loop	F: CTACTCCCCACCACCAGC R: CCAAATGGGGAAGGGGATAGT	Invitrogen
ERE-12s rRNA	F: TCGATAAACCCCGCTCTACC R: CGGTGTGTGCGTACTTCATT	Invitrogen
ER $\alpha$	F: TGATCCTACCAGACCCTTCAGT R: CCAATCATCAGGATCTCTAGCC	Invitrogen
GAPDH	F: CATGAGAAGTATGACAACAGCCT R: AGTCCTTTCCACGATACCAAAGT	Invitrogen
ND1	F: CCCCTTCGACCTGACAGAAG R: GGGCCGGCTGCGTATT	Invitrogen
p53	F: AGGAAATTTGCGTGTGGAGTAT R: TCCGTCCCAGTAGATTACCACT	Invitrogen
16s rRNA	F: GCCTGCCCAGTGACTAAAGTTT R: AACAAGTGATTATGCTACCTTTGCA	Invitrogen

Πίνακας 5. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διδακτορική διατριβή





**Πίνακας 6.** Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Α) το πλασμίδιο pEGFPC2, στο οποίο προσαρτήθηκε η αλληλουχία μιτοχονδριακού εντοπισμού (mitochondrial translocation sequence-mts) και φέρει την αλληλουχία κωδικοποίησης του υποδοχέα των οιστρογόνων  $\beta$  (pEGFP-mtER $\beta$ ), Β) το πλασμίδιο pGS5, στο οποίο έχει προστεθεί τόσο η αλληλουχία κωδικοποίησης του υποδοχέα των οιστρογόνων  $\beta$  (pGS5-ER $\beta$ ) όσο και η αλληλουχία κωδικοποίησης του υποδοχέα των οιστρογόνων  $\alpha$  (pGS5-ER $\alpha$ ). Αξίζει να αναφερθεί ότι επιλέχθηκε αυτό το πλασμίδιο για την έκφραση του ER $\alpha$  και του ER $\beta$ , καθώς η ύπαρξη του ιντρονίου της  $\beta$ -γλοβίνης βοηθάει στην έκφραση των δυο αυτών πρωτεϊνών, Γ) το πλασμίδιο pSV- $\beta$ -galactosidase είναι υπεύθυνο για τη παραγωγή της  $\beta$ -γαλακτοσιδάσης (ως σύστημα-μόριο αναφοράς στη διαδικασία της διαμόλυνσης των ευκαρυωτικών κυττάρων), ενώ Δ) το πλασμίδιο pTK-ERE-Luc είναι υπεύθυνο για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο της οιστρογονικής σηματοδότησης, καθώς σε αυτή τη κατασκευή, στον υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης υπάρχουν 3 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης των οιστρογόνων (EREs). Το πλασμίδιο pTK-ERE-Luc αποτελεί μια ευγενική χορηγία του Ερευνητή Α., κ. Αλέξη Μιχαήλ.

## **2.1 Καρκινικές σειρές – καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων**

Με σκοπό την μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH και για την μελέτη της επίδρασης του μιτοχονδριακού ER $\beta$  στις μιτοχονδριακές διεργασίες, χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές σειρές του μαστού MCF-7 και MDA-MB-231, οι νευροβλαστωματικές σειρές N2A και SH-SY5Y και η καρκινική σειρά HEK293 (όπως παρουσιάζονται στα Υλικά και Μέθοδοι, Πίνακας 3). Για την καλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυτταρικών σειρών N2A και SH-SY5Y, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό DMEM, 1 g/L, για την καλλιέργεια των κυττάρων HEK293, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό DMEM, 4,5 g/L, ενώ για την καλλιέργεια των κυττάρων MDA-MB-231 χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό RPMI και για την καλλιέργεια των κυττάρων MCF-7 χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό DMEM, 4,5 g/L, το οποίο εμπλουτίστηκε με Ινσουλίνη (10  $\mu$ g/ml) και E2 (0,1 nM) (όπως παρουσιάζονται στα Υλικά και Μέθοδοι, Πίνακας 2).

## **2.2 Δημιουργία εμβρυϊκού βόειου ορού απενεργοποιημένου με ζωάνθρακα (Charcoal inactivated serum - cis)**

Με σκοπό τη μελέτη της δραστηριότητας των υποδοχέων των οιστρογόνων υπό συνθήκες απουσία ορμονών από το μέσο ανάπτυξης των κυττάρων, είναι αναγκαία η καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικά μέσα παρουσία ορού (FBS), από τον οποίο έχουν αφαιρεθεί οι ορμόνες από τον εμβρυϊκό βόειο ορό. Η αφαίρεση των (λιπόφιλων) ορμονών εξασφαλίζεται από την επεξεργασία του FBS με ζωάνθρακα (charcoal treated serum). Η επώαση του ορού με διάλυμα δεξτράνης παρουσία ζωάνθρακα, οδηγεί στην συμπλοκοποίηση και συνεπώς στην απομάκρυνση, των μη-πολικών ενώσεων, όπως των λιπόφιλων μορίων (αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες), ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος και χωρίς να επηρεάζονται σημαντικά τα επίπεδα των αλάτων, της γλυκόζης, των αμινοξέων και των υπόλοιπων θρεπτικών στοιχείων.

Το αρχικό διάλυμα ζωάνθρακα, περιέχει:

<b>Ζωάνθρακας</b>	<b>2,5% w/v</b>
<b>Δεξτράνη (Dextran)</b>	<b>0,25% w/v</b>
<b>Διάλυμα Tris-HCl, pH=7.4</b>	<b>10 mM</b>

Προστίθεται 1/5 V από το παραπάνω διάλυμα σε 1V ορού. Ο ορός επωάζεται με τον ζωάνθρακα για 30 λεπτά, στους 56°C, υπό συνεχή ανάδευση (310 rpm). Έπειτα, φυγοκεντρείται το διάλυμα ορού-ζωάνθρακα για 10 λεπτά στα 10.000g, ώστε το σύμπλοκο ζωάνθρακα-ορμονών να σχηματίσει ένα ίζημα και να διαχωριστεί από τον υπόλοιπο ορό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται, έτσι ώστε να επιτευχθεί η αφαίρεση των ορμονών από τον ορό. Τέλος, η τελική ποσότητα ορού, η οποία προέκυψε από την προαναφερθείσα διαδικασία, φιλτράρεται σε αποστειρωμένες συνθήκες (σε Laminar Flow Hood) με τη χρήση φίλτρων, με 0,22 µm διαμέτρου πόρων. Ο επεξεργασμένος με ζωάνθρακα ορός αποθηκεύεται στους -20 °C.

## 2.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (Transfection)

Η διαμόλυνση αναφέρεται συνήθως στην εισαγωγή νουκλεϊνικών οξέων σε ευκαρυωτικά κύτταρα ή, πιο συγκεκριμένα, σε ζωικά κύτταρα. Κλασικά, ο όρος διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε για να υποδηλώσει την πρόσληψη ιικού νουκλεϊκού οξέος από ιό ή βακτηριοφάγο που μολύνει προκαρυώτες, με αποτέλεσμα μόλυνση και παραγωγή ώριμων σωματιδίων ιού. Ωστόσο, η χρήση του όρου σήμερα περιλαμβάνει οποιαδήποτε τεχνητή

εισαγωγή ξένου νουκλεϊνικού οξέος σε ένα κύτταρο. Σε γενικές γραμμές, η διαμόλυνση είναι η διαδικασία τεχνητής εισαγωγής νουκλεϊνικών οξέων (DNA ή RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας χημικές, βιολογικές ή φυσικές μεθόδους, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή των ιδιοτήτων του κυττάρου, επιτρέποντας τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας και της έκφρασης πρωτεϊνών. Κατά τη διαμόλυνση, το εισαχθέν νουκλεϊνικό οξύ μπορεί να υπάρχει παροδικά στα κύτταρα, έτσι ώστε να εκφράζεται μόνο για περιορισμένο χρονικό διάστημα (δεν αναδιπλασιάζεται) ή και σταθερά, καθώς μπορεί να είναι αναδιπλασιάζεται όταν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή.

### **2.2.1 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου παρουσία φωσφορικών ιόντων**

Η διαμόλυνση με τη χρήση του φωσφορικού ασβεστίου αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο παροδικής αλλά και σταθερής διαμόλυνσης των ευκαρυωτικών κυττάρων, κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους, της εύκολης εφαρμογής του πρωτοκόλλου, και τέλος της εφαρμογής της σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών σειρών. Η απόδοση της διαμόλυνσης των ευκαρυωτικών κυττάρων με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες του pH, της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού άλατος. Επιπλέον μπορεί να είναι κυτταροτοξική σε πολλούς τύπους κυτταρικών καλλιιεργειών, ιδιαίτερα σε καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων.

Η μέθοδος βασίζεται στην συν-κατακρήμνιση του φωσφορικού ασβεστίου με το DNA. Η συνκατακρήμνιση επιτυγχάνεται με ανάμειξη του DNA με χλωριούχο ασβέστιο παρουσία ενός ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων, ώστε να δημιουργηθεί ένα ίζημα φωσφορικού ασβεστίου-DNA, το οποίο στη συνέχεια διασπείρεται στα κύτταρα. Το φωσφορικό ασβέστιο διευκολύνει τη δέσμευση του DNA στην κυτταρική επιφάνεια και το DNA εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκύτωση.

Πειραματικά, απαιτείται η πληρότητα (confluency) της επιφάνειας, η οποία φέρει τα προς διαμόλυνση κύτταρα, κατά 50%. 4 ώρες πριν τη διαμόλυνση απαιτείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου των κυττάρων με φρέσκο θρεπτικό μέσο. Πρακτικά, δημιουργούνται δυο διαλύματα ίσου όγκου: το διάλυμα Α περιέχει : το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA, η κατάλληλη ποσότητα 2M  $\text{CaCl}_2$  (η βέλτιστη αναλογία  $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l CaCl}_2$  επιλέγεται μετά από τον έλεγχο των συνθηκών διαμόλυνσης για κάθε κυτταρικό τύπο - για τα κύτταρα N2A όσο και για τα HEK293 χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 1:4) και για την επίτευξη του επιθυμητού

όγκου προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα νερού (ddH<sub>2</sub>O). Αντίστοιχα το διάλυμα Β περιέχει HBSx2. Τα δυο διαλύματα αναδεύονται και προστίθεται το διάλυμα Β στο διάλυμα Α σταγόνα-σταγόνα (dropwise). Ακολουθεί επώαση του ενιαίου διαλύματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη του ενιαίου διαλύματος στα κύτταρα. Το θρεπτικό μέσο, μαζί με το διάλυμα διαμόλυνσης, αντικαθίσταται 12-16 ώρες μετά. Να σημειωθεί ότι το ενιαίο διάλυμα πρέπει να αποτελεί το 1/10 του τελικού όγκου, στον οποίο βρίσκονται τα προς διαμόλυνση κύτταρα.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται η σύσταση του διαλύματος HBSx2.

Συστατικά	Συγκέντρωση
Διάλυμα Hepes	50mM
Διάλυμα Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5mM
Διάλυμα NaCl <sub>2</sub>	280mM

### 2.2.2. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση κατιονικών λιποσωμάτων

Η διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση κατιονικών λιπιδίων αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο παροδικής ή και σταθερής διαμόλυνσης, καθώς αποτελεί μια γρήγορη και απλή μέθοδο εισαγωγής DNA, RNA, siRNA ή και ολιγονουκλεοτιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιτρέπει την εξαιρετικά αποτελεσματική διαμόλυνση ενός μεγάλου φάσματος κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των προσκολλημένων κυττάρων, των αιωρούμενων κυττάρων, των κυττάρων των εντόμων, καθώς και των πρωτογενών κυτταρικών καλλιιεργειών.

Η βασική δομή των κατιονικών λιπιδίων αποτελείται από μία θετικά φορτισμένη ομάδα (κεφαλή) και μία ή δύο αλυσίδες υδρογονάνθρακα. Η θετικά φορτισμένη κεφαλή ρυθμίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του λιπιδίου και του φωσφορικού σκελετού των νουκλεϊκών οξέων. Το θετικό (επιφανειακό) φορτίο των λιποσωμάτων προκαλεί την αλληλεπίδραση του νουκλεϊκού οξέος και της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου, επιτρέποντας την σύντηξη του συμπλόκου λιποσώματος - νουκλεϊκού οξέος με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Το σύμπλοκο εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης.

Πειραματικά, απαιτείται η πληρότητα (confluency) της επιφάνειας, η οποία φέρει τα προς διαμόλυνση κύτταρα, κατά 70%-90%. 30 λεπτά πριν τη διαμόλυνση απαιτείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου των κυττάρων με φρέσκο θρεπτικό μέσο OptiMEM (θρεπτικό μέσο

απουσία FBS και αντιβιοτικών). Πρακτικά, δημιουργούνται δυο διαλύματα ίσου όγκου: το διάλυμα Α φέρει το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA διαλυμένο σε θρεπτικό μέσο OptiMEM, ενώ το διάλυμα Β εμπεριέχει τη Lipofectamine 2000 (η βέλτιστη αναλογία  $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l Lipofectamine}$  ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων - για τα κύτταρα MCF-7 χρησιμοποιήθηκε η αναλογία  $1\mu\text{g DNA} : 4\mu\text{l Lipofectamine 2000}$ ) διαλυμένη σε θρεπτικό μέσο OptiMEM. Τα δυο διαλύματα αναμειγνύονται και το ενιαίο διάλυμα επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι και προστίθεται στα κύτταρα. Το θρεπτικό μέσο, μαζί με το διάλυμα διαμόλυνσης, αντικαθίσταται 4 ώρες μετά.

## 2.4 Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων

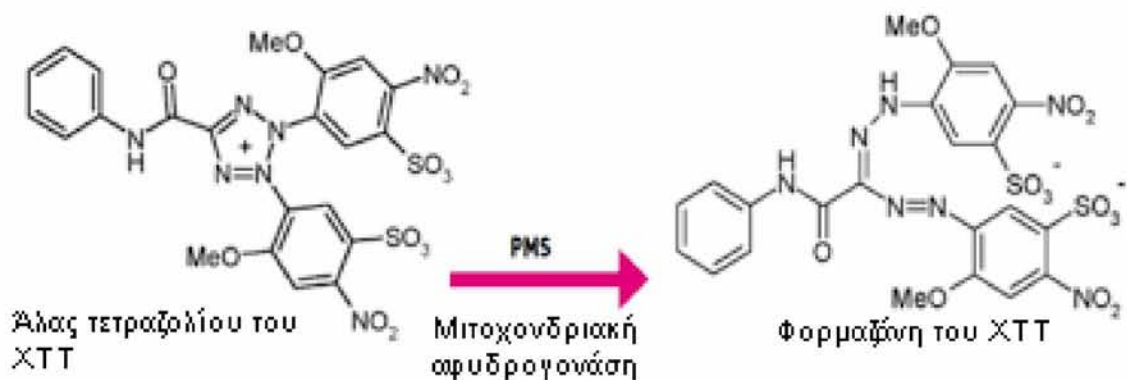
Στα πλαίσια της μελέτης της επίδρασης του μιτοχονδριακού ERβ στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των νευρικών κυττάρων, δημιουργήθηκε μια νέα νευρική, καρκινική κυτταρική σειρά, η οποία εκφράζει τον μιτοχονδριακή πρωτεΐνη GFP- ERβ (δηλαδή τη χημειρική πρωτεΐνη GFP-ERβ, η οποία στο αμινοτελικό άκρο φέρει την αλληλουχία-οδηγό, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μιτοχονδριακή στόχευση της πρωτεΐνης). Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τα νευροβλαστωματικά κύτταρα N2A, τα οποία μετασχηματίστηκαν με τον κατάλληλο φορέα (pEGFPC2-mtERβ) που έφερε την αλληλουχία νουκεοτιδίων που κωδικοποιεί την έκφραση του mtGFP-ERβ αλλά και με το φορέα pEGFPC2-mt (αποτελούν τα κύτταρα αναφοράς-control). Έτσι, δημιουργήθηκαν οι κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Η διαδικασία του σταθερού μετασχηματισμού είναι η εξής:

- 1) Κύτταρα N2A ( $8 \times 10^5$  κύτταρα, δηλαδή 70% confluency) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο X, σε τριβλίο (dish) των 35mm
- 2) Μετά τη πάροδο 24 ωρών, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τη χρήση της Lipofectamine 2000 (σε αναλογία  $2\mu\text{l Lipofectamine 2000} : 1\mu\text{g DNA}$ ) με τους κατάλληλους φορείς και σε θρεπτικό μέσο OptiMEM (απουσία αντιβιοτικών). Χρησιμοποιήθηκαν 8  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου pmtEGFP-ERβ
- 3) 48 ώρες μετά, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και μεταφερθήκαν σε τριβλίο των 150mm. Στο θρεπτικό προστίθεται και το αντιβιοτικό G418 (Geneticin), σε συγκέντρωση 1 mg/ml, ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της επιλογής των διαμολυσμένων κυττάρων (selection). Το θρεπτικό μέσο με τη παρουσία του G418 ανανεώνεται κάθε 4-5 μέρες.

- 4) Μετά από 2 βδομάδες συνεχούς κατεργασίας των κυττάρων με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με G418, στις οποίες έχουν σχηματιστεί οι αποικίες των εν δυνάμει μετασχηματισμένων κυττάρων, συλλέγονται αποικίες (35-40), οι οποίες μεταφέρονται σε τριβλία 24 θέσεων. Κατά την παραμονή των αποικιών στα 24 well plate συνεχίστηκε η διαδικασία της επιλογής με το αντιβιοτικό.
- 5) Περίπου 5 μέρες μετά μεταφέρουμε τις αποικίες σε 6 well plate και ταυτοποιούμε την ύπαρξη σταθερά μετασχηματισμένων αποικιών, καταρχήν, με την εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού και κατόπιν με ανάλυση Western blot και Real Time PCR.
- 6) Από την ταυτοποίηση, προέκυψαν 2 αποικίες κυττάρων N2AmtGFPERβ και 2 αποικίες κυττάρων N2AmtGFP, οι οποίες εμφανίζουν εμπλουτισμό ως προς την έκφραση των mtGFP-ERβ και mtGFP, αντίστοιχα. Έτσι, αυτές μεταφέρθηκαν σε φλάσκες T-25 και στην συνέχεια παγώθηκε-αποθηκεύτηκε ένας ικανός αριθμός κυττάρων (cryovials) για μελλοντική χρήση.

## 2.5 Μέθοδος XTT

Το XTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων (ως συνάρτηση του αριθμού των κυττάρων) με βάση τη μεταβολική τους δραστηριότητα και αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και μη-ραδιενεργή αντίδραση. Το άλας του τετραζολίου του XTT (2,3-δις-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζολιο-5-καρβοξυανιιδίου) διασπάτε από το σύμπλοκο της μιτοχονδριακής αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού και σχηματίζεται φορμαζάνη. Μόνο ζωντανά κύτταρα, που έχουν άθικτη μιτοχονδριακή μεμβράνη και ακεραία κυτταρική μεμβράνη, έχουν ενεργή την αφυδρογονάση του ηλεκτρικού. Παράγοντες που μεταβάλλουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και διαταράσσουν τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας θα αδρανοποιήσουν το ένζυμο και επομένως θα σταματήσουν το σχηματισμό της φορμαζάνης (η οποία έχει χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα). Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία της μεθοθεικής φαιναζίνης (PMS), η οποία χρησιμεύει ως ενδιάμεσο δέκτη ηλεκτρονίων. Η αντίδραση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Πρακτικά, για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού:

- 1) κύτταρα καλλιεργούνται σε 96 well plate και επωάζονται για 2 μέρες σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών με τους προς μελέτη παράγοντες-ουσίες
- 2) τη μέρα της μέτρησης, δημιουργούνται δυο διαλύματα: το διάλυμα Α, το οποίο περιέχει 10 mM του παράγοντα PMS σε διάλυμα PBS και το διάλυμα Β, το οποίο περιέχει το άλας ΧΤΤ (1 mg/ml) διαλυμένο σε θρεπτικό μέσο.
- 3) τα δυο διαλύματα αναμειγνύονται, δημιουργώντας το διάλυμα Γ, το οποίο αναδεύεται έντονα και προστίθεται στα κύτταρα
- 4) τα κύτταρα, τα οποία έχουν πλέον και το άλας ΧΤΤ στο θρεπτικό τους μέσο, επωάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 2 ώρες
- 5) μετράμε το σχηματισμό της φορμαζίνης στα 450 nm (σε φασματοφωτόμετρο 96 θέσεων), ενώ παράλληλα μετράμε στα 600 nm την ένταση του μη-ειδικού σήματος (background)

## 2.6 Απομόνωση εμπλουτισμένων μιτοχονδριακών κλασμάτων

Η υποκυτταρική κλασμάτωση αποτελεί μια μέθοδο, η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό των οργανιδίων του κυττάρου με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες και αποτελείται από δύο σημαντικά στάδια: την ελεγχόμενη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης (ομογενοποίηση) και την κλασμάτωση των υποκυτταρικών συστατικών, με σκοπό το διαχωρισμό των υποκυτταρικών οργανιδίων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρωσης και αποσκοπεί σταδιακά στη λήψη υποκυτταρικών κλασμάτων όπως 1) πυρήνες και άσπαστα κύτταρα, 2) εμπλουτισμένο κλάσμα μιτοχονδρίων, 3) μετα-μιτοχονδριακό υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί κλάσμα εμπλουτισμένο σε κυτταροπλασματικά συστατικά. Κάθε κλάσμα οργανιδίων διαφοροποιείται από το μέγεθος,

την πυκνότητα, το φορτίο, δηλαδή παραμέτρους πάνω στις οποίες βασίζεται και ο διαχωρισμός τους.

Για τη λήψη επαρκούς μιτοχονδριακού κλάσματος ικανού για τις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες, τα υπό μελέτη κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία των 150×20 mm. Η διαδικασία της κλασμάτωσης πραγματοποιείται στους 4°C, ώστε να αποφευχθεί η πρωτεόλυση και πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στη δημοσίευση Psarra et al., 2005:

Συνοπτικά, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας από τα τρυβλία των 150×20 mm, αυτά εκπλένονται με PBS×1 (στους 4°C) και έπειτα προστίθεται το διάλυμα ομογενοποίησης (Διάλυμα Α), στο οποίο έχουν προστεθεί 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche, έτσι ώστε να αποφευχθεί η πρωτεόλυση. Τα κύτταρα συλλέγονται με το διάλυμα Α και ομογενοποιούνται, σε μηχανικό ομογενοποιητή Potter Elvehjem (η ομογενοποίηση πραγματοποιείται στα 2000 rpm). Μετά την ομογενοποίηση, το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 2500 rpm, στους 4°C, για την απομάκρυνση των πυρήνων, των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και των μη-λυμένων κυττάρων. Έτσι, το υπερκείμενο, στο οποίο υπάρχουν και τα μιτοχόνδρια, συλλέγεται και φυγοκεντρείται εκ νέου για 20 λεπτά, στα 12000 rpm και στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το ίζημα, στο οποίο υπάρχουν τα μιτοχόνδρια, επαναδιαλυτοποιείται στο Διάλυμα Β. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης (12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C) και της επαναδιαλυτοποίησης του ιζήματος στο Διάλυμα Β επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και τέλος το ίζημα που απομένει αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα (mitochondrial fraction - MITO), το οποίο φυλάσσεται στους -80 °C.

Διάλυμα Α	Τελικές Συγκεντρώσεις	Διάλυμα Β	Τελικές Συγκεντρώσεις
Hepes-KOH, pH=7,5	20mM	Tris-HCl, pH =7,5	20mM
KCl	10mM	EDTA	2,5mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	Μαννιτόλη	210mM
EDTA	1mM	Σουκρόζη	70mM
EGTA	1mM		
Σουκρόζη	250mM		

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά το πέρας της ομογενοποίησης, μια μικρή ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος συλλέγεται και αποτελεί το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (total extract - TE), το οποίο χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για την εκάστοτε πειραματική διαδικασία. Επίσης, το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρωσης αποτελεί το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα (post-



mitochondrial fraction - PM), το οποίο περιλαμβάνει το κυτταρόπλασμα, μικροσωμάτια και θραύσματα της πλασματικής μεμβράνης και συλλέγεται προς μελέτη-ως μάρτυρας για την εκάστοτε πειραματική διαδικασία.

## **2.7 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της Real Time PCR**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR), επίσης γνωστή ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative PCR - qPCR), είναι μια εργαστηριακή-μοριακή τεχνική βασισμένη στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Παρακολουθεί την ενίσχυση ενός στοχευόμενου μορίου DNA κατά τη διάρκεια της PCR, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο, και όχι στο τέλος της αντίδρασης πολυμερισμού, όπως συμβαίνει με την συμβατική PCR.

Γενικά, υπάρχουν δύο μέθοδοι για την ανίχνευση προϊόντων PCR με τη χρήση της Real Time PCR: (1) η χρήση μη ειδικών φθορίζοντων χρωστικών, οι οποίες παρεμβάλλονται στο δίκλωνο DNA και (2) με τη χρήση DNA-ανιχνευτών ειδικής αλληλουχίας που αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζοντα μόρια αναφοράς και επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο μετά από τον υβριδισμό του ανιχνευτή με την συμπληρωματική του αλληλουχία. Η Real Time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για: την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, για διαγνωστικούς σκοπούς, για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών (παθογόνων και μη), για τη κλινική γενοτύπηση αλλά και για τη ταυτοποίηση γενετικά μετασχηματισμένων οργανισμών.

Στη παρούσα πειραματική διαδικασία ποσοτικοποίησης της έκφρασης γονιδίων, αρχικά, απομονώθηκε το ολικό RNA, ποσοτικοποιήθηκε, ακολούθησε πέψη με DNάσες, αντίστροφη μεταγραφή και τελικά Real Time PCR.

Απομόνωση ολικού RNA: για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Trizol, το οποίο αποτελείται από θειοκυανικό γουανίδιο-φαινόλη-χλωροφόρμιο που συμμετέχουν στο διαχωρισμό και στην απομόνωση του RNA από το DNA αλλά και τις πρωτεΐνες του δείγματος. Το Trizol αποτελεί ένα εξαιρετικά φωτοευαίσθητο διάλυμα, το οποίο δρα διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης-λύσης του κυτταρικού δείγματος, ενώ συγχρόνως διαταράσσει και διασπά τα κύτταρα και τα κυτταρικά συστατικά.

Κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από καλλιέργεια σε 6 well plate διαλυτοποιούνται σε 500 μl Trizol (ανά δείγμα) κι ακολουθεί επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl χλωροφόρμιου/δείγμα (απαιτείται καλή ανάμειξη) και επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 15 λεπτά στα 11000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παρατηρούνται 3 φάσεις:

- 1) Η υδατική στην οποία περιέχεται το RNA,
- 2) Η μέση φάση που περιέχει το DNA και
- 3) Η οργανική που περιέχει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια

Συνεπώς, συλλέγεται η υδατική φάση με ιδιαίτερα προσεκτικούς χειρισμούς σε ξεχωριστό eppendorf για το κάθε δείγμα. Προστίθενται 250 μl ισοπροπανόλης/δείγμα και τα δείγματα επωάζονται για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 11000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Η προσθήκη της ισοπροπανόλης συντελεί στην κατακρήμνιση του RNA υπό τη μορφή ιζήματος. Μετά το πέρας τη φυγοκέντρωσης, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα σε αιθανόλη 80% και πραγματοποιείται και μια τρίτη φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 8000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Η προσθήκη της αιθανόλης αποσκοπεί στην έκπλυση του RNA και βοηθάει στην κατακρήμνισή του. Αφαιρείται η αιθανόλη και η εξάτμιση της εναπομείνουσας αιθανόλης από το δείγμα (air-dry). Έπειτα, επαναδιαλυτοποιείται το απαλλαγμένο από οργανικούς διαλύτες ίζημα σε ddH<sub>2</sub>O και ακολουθεί ένα βήμα ποσοτικοποίησης των επιπέδων του ολικού RNA που έχει απομονωθεί από το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με φωτομέτρηση του κάθε δείγματος στα 260 nm και 280 nm, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA και για τον έλεγχο της καθαρότητάς του (πρόσμειξη με πρωτεΐνες), αντίστοιχα.

Πέψη με DNάσες: για την απομάκρυνση, από τα δείγματα, μορίων DNA, τα οποία πιθανώς συν-κατακρημνίστηκαν μαζί με το RNA, πραγματοποιείται κι ένα βήμα πέψης με DNάσες, χρησιμοποιώντας το kit RQ1 RNase-Free DNase της Promega, το οποίο εξασφαλίζει την αποδόμηση τόσο του δίκλωνου όσο και του μονόκλωνου DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης (όπως προτείνεται από την εταιρία προμήθευσης του kit) είναι 10 μl, εκ των οποίων το 1 μl αντιστοιχεί στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης της DNάσης απαλλαγμένο από RNάσες (RQ1 RNase-Free DNase 10× Reaction Buffer) και τα 3 μl αντιστοιχούν στο ένζυμο της DNάσης απαλλαγμένο από RNάσες (RQ1 RNase-Free DNase). Τα υπόλοιπα 6 μl αποτελούνται από το δείγμα (3 μg RNA) και ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί :

- 1) Θέρμανση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 λεπτά

- 2) Προσθήκη 1 μl σε κάθε δείγμα από το αντιδραστήριο RQ1 DNase Stop Solution ώστε να μεταβληθεί το pH και να καταστεί ανενεργό το ένζυμο
- 3) Θέρμανση όλων των δειγμάτων στους 65 °C για 5 λεπτά.

Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription PCR - RT-PCR): Κατά την RT-PCR μετατρέπεται το RNA σε cDNA, το οποίο αποτελεί και το υπόστρωμα για τη μέθοδο της Real Time PCR με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφής. Το ένζυμο χρησιμοποιεί τα ώριμα mRNA ως υπόστρωμα για τη σύνθεση cDNA. Χρησιμοποιήθηκε το kit SuperScript II Reverse Transcriptase, της Invitrogen. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Σε ένα eppendorf (των 0,2 ml) προστίθενται 10 μl από το προϊόν της αντίδρασης πέψης με DNάση καθώς και 1 μl τυχαίων εξαμερών (random hexamers) και 1 μl μείγματος dNTPs
- 2) Ακολουθεί θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά
- 3) Γρήγορη μεταφορά στον πάγο, σύντομη φυγοκέντρωση στα 12.000 g και προσθήκη 4 μl 5x First-Stand Buffer, 2 μl DTT 1M και 1μl RNaseOUT 40u/μL, (ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει DTT και αναστολείς RNασών)
- 4) Ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Προσθήκη 1μl από το ένζυμο SuperScript II RT (αντίστροφη μεταγραφάση), ανάδευση κι επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 6) Επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά
- 7) Τερματισμός της αντίδρασης με επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για 15 λεπτά

PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR): Στις πειραματικές μελέτες της παρούσα διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε το kit SYBR Select Master Mix της Applied Biosystem. Το διάλυμα αυτό αποτελεί μείγμα της AmpliTaq DNA πολυμεράσης (UP), της χρωστικής SYBR Green ER, των dNTPs, του ενζύμου UDG (Uracil-N-Glycosylase) καθώς και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Πιο συγκεκριμένα κάθε αντίδραση τελικού όγκου 20 μl, περιείχε:

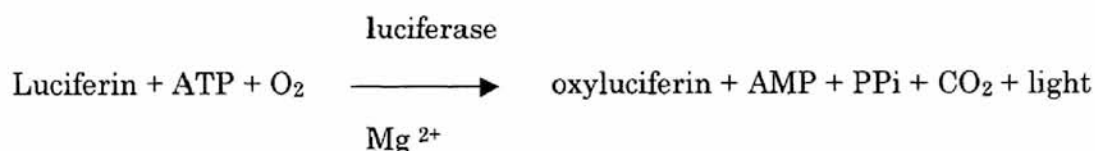
SYBR Green Mater Mix 2x	1x (10 μl)
Εκκινητής 1 (10μM)	250 nM
Εκκινητής 2 (10μM)	250 nM
ddH2O	(ως τον τελικό όγκο των 20 μl)
cDNA	2,5 ng

Επίσης, το θερμικό προφίλ που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

Ενεργοποίηση UDG	2 min στους 52 °C	40 κύκλοι
Ενεργοποίηση πολυμεράσης	2 min στους 95 °C	
Αποδιάταξη (Denaturation)	15 sec στους 95 °C	
Υβριδοποίηση (Annealing)	15 sec στους 55 °C	
Επέκταση (Extension)	1 min στους 72 °C	
Συλλογή δεδομένων	1 min στους 95 °C και 30 sec στους 55 °C	

## 2.8 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστηριότητας λουσιφεράσης / β-γαλακτοσιδάσης

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας είναι ένζυμο, το οποίο εκπέμπει φως και είναι υπεύθυνο για τη βιοφωταγεία των πυγολαμπίδων και των σκαθαριών. Το ένζυμο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης και η αντίδραση αυτή απαιτεί οξυγόνο και ATP. Λόγω της χρήσης του ATP ως υπόστρωμα από την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας, αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιοτεχνολογία. Η χημική αντίδραση που καταλύεται είναι η εξής:



Το φως παράγεται καθώς η αντίδραση σχηματίζει οξυλουσιφερίνη σε ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση και η αντίδραση απελευθερώνει ένα φωτόνιο καθώς η οξυλουσιφερίνη επιστρέφει στην αρχική (μη διεγερμένη) κατάσταση.

Η ενζυμική δραστηριότητα της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης, προσδιορίζεται σε κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση τόσο της λουσιφεράσης όσο και της β-γαλακτοσιδάσης.

Δοκιμασία λουσιφεράσης : Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην ανάχυνση του φωτός που παράγεται από την οξείδωση της λουσιφερίνης. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP. Το μίγμα της αντίδρασης είναι φωτοευαίσθητο και συνίσταται από:

<b>Tris-HCl, pH=8</b>	<b>20mM</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>2,67mM</b>
<b>EDTA</b>	<b>0,1mM</b>
<b>Co-enzym A (CoA)</b>	<b>270μM</b>
<b>Luciferine</b>	<b>470μM</b>
<b>ATP</b>	<b>530μM</b>
<b>DDT</b>	<b>33,3mM</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>-</b>

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται 10 μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίζεται με τη μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο (Berthold Technologies, LuBat 39508) και εκφράζεται σε μονάδες RLU. Οι τιμές της δραστηριότητας της λουσιφεράσης προς τις τιμές της δραστηριότητας της γαλακτοσιδάσης, αποτελούν τη κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και υποδεικνύουν μεταγραφική ενεργότητα του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα (ERs, NF-kB κλπ).

Προσδιορισμός δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης: Κατά τη διεξαγωγή αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται τόσο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της παροδικής διαμόλυνσης όσο και η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας της λουσιφεράσης. Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο με δράση υδρολάσης γλυκοσιδίων και καταλύει την υδρόλυση των β-γαλακτοσιδίων σε μονοσακχαρίτες, μέσω της θραύσης ενός γλυκοσιδικού δεσμού. Η β-γαλακτοσιδάση έχει ως υπόστρωμα του γαγγλιοζίτες, τη λακτόζη και διάφορες γλυκοπρωτεΐνες. Πειραματικά, η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται μελετώντας την υδρόλυση του άχρωμου υποστρώματος 2-νιτροφαινυλ-b-D-γαλακτοπυρανοσίδη (2-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside - ONPG), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Λύση με χρήση διαλύματος λύσης και υπερήχων (Sonication): Αρχικά, γίνεται λύση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη διαλύματος λύσης (lysis buffer), ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστοτε ιζήματος. Να σημειωθεί ότι στο διάλυμα λύσης προστίθενται και 1mM DTT (διθειοθρεϊτόλη), η οποία εμποδίζει τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες και 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), το οποίο αναστέλλει τις πρωτεάσες σερίνης.

Διάλυμα Λύσης (Lysis Buffer)	Συγκεντρώσεις
Tris-HCl, pH=7.4	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1% v/v

Τα κύτταρα επωάζονται για 20-25 λεπτά στο πάγο. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λύσης των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων, όπου επιτυγχάνεται η αποτελεσματικότερη ομογενοποίηση του κυτταρικού εκχυλίσματος και ο κατακερματισμός του DNA. Ο χρόνος και η ένταση της λύσης με τη χρήση υπερήχων ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων. Συνήθως, απαιτούνται 3-4 σετ (κάθε σετ διαρκεί 1 δευτερόλεπτο έκθεσης σε υπερήχους και κάθε σετ πρέπει να απέχει από το προηγούμενο 40 δευτερόλεπτα), τα οποία πραγματοποιούνται στο πάγο.

Χρωματογραφική μέθοδος Bradford για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών: Η δοκιμασία Bradford, είναι μια χρωματομετρική μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250 υπάρχει σε τρεις μορφές: την ανιονική (μπλε), την ουδέτερη (πράσινη) και την κατιονική (κόκκινη). Υπό όξινες συνθήκες, η κόκκινη μορφή της χρωστικής μετατρέπεται στην κυανή, κατά τη σύνδεσή της με πρωτεΐνες. Η χρώση σχηματίζει ένα ισχυρό, μη ομοιοπολικό σύμπλοκο με την καρβοξυλική ομάδα των πρωτεϊνών αλλά και με την αμινομάδα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595 nm.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιούμε 1 ml από το αντιδραστήριο Bradford (Biorad) και μέγιστο 10 µl από το εκάστοτε πρωτεϊνικό εκχύλισμα, τα οποία αναμειγνύονται σε ένα eppendorf. Μετά την εικοσάλεπτη επώαση του προαναφερθέντος μίγματος στο σκοτάδι, πραγματοποιείται ο προσδιορισμός απορρόφησής του, με τη χρήση του φωτόμετρου. Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από την εξίσωση που προέκυψε μετά από κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης με αυξημένες συγκεντρώσεις της



πρωτεΐνης BSA. Ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος Excel, παρέχουν τελικά την ακριβή πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων, η οποία απαιτείται για την ηλεκτροφόρηση.

### **2.9.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE)**

Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού εκχυλίσματος διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μπορεί να γίνεται με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI), το μοριακό βάρος, το ηλεκτρικό φορτίο ή και με συνδυασμό αυτών των παραγόντων. Η φύση του διαχωρισμού εξαρτάται από την επεξεργασία του δείγματος και τη φύση της πηκτής. Ο πιο κοινός τύπος ηλεκτροφόρησης σε πηκτή είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία του δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate - SDS). Η παρουσία του SDS προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα αυτές να μετακινούνται στο θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, μέσω του πλέγματος πολυακρυλαμιδίου του πηκτώματος. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους, με τις μικρότερες πρωτεΐνες να μεταναστεύουν γρηγορότερα μέσω αυτού του πλέγματος. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου καθορίζει και την ικανότητα διαχωρισμού της πηκτής με βάση το μέγεθος των πρωτεϊνών, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου, τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους. Όσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση πρωτεϊνών υψηλότερου μοριακού βάρους.

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου: Οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα συμύκνωσης), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται αφού οι πρωτεΐνες περάσουν σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα διαχωρισμού). Το πήκτωμα συμύκνωσης (stocking gel) περιέχει 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS και 4% (w/v) ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), περιέχει 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και 10 ή 12 % (w/v) ακρυλαμίδιο. Ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη 1% (w/v) APS (Ammonium persulfite) και 0,04% (v/v) TEMED (αποτελεί καταλύτη του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου).

Παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση: Από τα πρωτεϊνικά δείγματα, τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bradford, επιλέχθηκε ο κατάλληλος όγκος, ο οποίος να



αντιστοιχεί σε 50 mg συνολικής πρωτεΐνης και σε αυτόν το όγκο προστίθεται κατάλληλος όγκος Διαλύματος φόρτωσης δείγματος (Sample Buffer) 4x και διάλυμα Tris-HCl, pH=7,5 (ώστε η τελική συγκέντρωση του Sample Buffer να είναι ίση με 1x). Καθ' όλη τη διάρκεια της παρασκευής τους τα δείγματα παραμένουν στον πάγο (4°C).

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση: Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα θερμαίνονται στους 95°C, για 5 λεπτά, συνθήκες οι οποίες είναι αποδιατακτικές. Ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη (η οποία αποτελεί συστατικό του Sample Buffer) προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών και την κατάργηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Protein Marker), οι οποίες χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

Ηλεκτροφόρηση: Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02 A, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Running Buffer 1x) που περιέχει 0,1 % w/v SDS.

## **2.10 Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot**

Η ανάλυση στυπώματος Western είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική, η οποία βρίσκει εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, την ανοσολογία και σε άλλους κλάδους της μοριακής βιολογίας, με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα βιολογικό δείγμα με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των επιθυμητών πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τόσο ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα όσο και μιτοχονδριακά κλάσματα.

### **2.10.1 Μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Κατά την ανάλυση Western blot, πραγματοποιείται ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από μια πηκτή σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF), όπου στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός και ο ημισοποσοτικός προσδιορισμός των ειδικών αντισωμάτων.

Οι πρωτεΐνες, μετά από το διαχωρισμό τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρονται σε σταθερό μεμβρανικό υπόστρωμα νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ενός κάθετου (προς

τις δυο επιφάνειες) ηλεκτρικού πεδίου. Το διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) περιέχει SDS και μεθανόλη. Το SDS αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς αλλά μειώνει την πρόσδεση των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη. Η μεθανόλη χρησιμοποιείται γιατί αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, αλλά δυσχεραίνει την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το πηκτώμα. Στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο. Συγκεκριμένα μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η εξισορρόπηση της πηκτής με εμποτίση αυτής στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, ενώ παράλληλα η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και απορροφητικό χαρτί Whatmann (σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από αυτό του πηκτώματος), επίσης εμβαπτίζονται στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς μαζί με δύο σφουγγαράκια προκαθορισμένου και ίδιου μεγέθους. Έπειτα, στην πλευρά της κασετίνας (μαύρου χρώματος) όπου θα εφαρμοστεί ο αρνητικός πόλος του τροφοδοτικού, τοποθετούνται κατά σειρά με τη μέθοδο "sandwich": ένα σφουγγαράκι, δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann, το πηκτώμα πολυακρυλαμιδίου, η νιτροκυτταρίνη, δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann, ένα σφουγγαράκι και η αναδιπλούμενη πλευρά της συσκευής (λευκού χρώματος). Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με εφαρμογή ρεύματος σταθερής έντασης 0,35 A για 70 λεπτά στους 4 °C. Με το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα PBST και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C.

### 2.10.2 Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων

Ο αποκλεισμός (Blocking) των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης (πάνω στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) επιτυγχάνεται με την επώαση της μεμβράνης σε ένα διάλυμα TBST ή PBST, το οποίο παρέχει πρωτεΐνη (συνήθως 3-5% αλβουμίνης βοοειδούς ορού (BSA) ή 10% μη λιπαρό ξηρό γάλα). Το Blocking περιορίζει την μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στη μεμβράνη κατά την ανάλυση Western blot και κατά συνέπεια τη λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

### 2.10.3 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

Μετά τη διαδικασία Blocking, πρωτογενές αντίσωμα κατάλληλης συγκέντρωσης, το οποίο βρίσκεται σε διάλυμα PBST ή TBST που περιέχει 2% άπαχο γάλα επωάζεται με τη μεμβράνη υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί η έκπλυση των μεμβρανών με το ρυθμιστικό διάλυμα PBST

για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων. Το διάλυμα αντισώματος και η μεμβράνη μπορούν να σφραγιστούν και να επωαστούν μαζί για 30 λεπτά έως και 16 ώρες.

Στην συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι γνωστό ως δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα συνδέεται με τη βιοτίνη ή ένα ένζυμο αναφοράς, όπως την αλκαλική φωσφατάση ή την υπεροξειδάση ραπανίδος (horseradish peroxidase-HRP). Στην περίπτωση της σήμανσης με HRP παράγεται φωταύγεια με τη προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος, κατ'αναλογία προς την ποσότητα της πρωτεΐνης. Ένα ευαίσθητο φύλλο φωτογραφικού φιλμ τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη και η έκθεση αυτού στο φως από την αντίδραση χημειοφωταύγειας δημιουργεί ένα αποτύπωμα που αντιπροσωπεύει την σήμανση και τον εντοπισμό των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Μετά το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης, γίνεται επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα και ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1-1,5 ώρες. Για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP, η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence), το οποίο βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Συγκεκριμένα με το πέρας των πλύσεων της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης από το δευτερογενές αντίσωμα, αυτή επωάζεται για 3 λεπτά με μείγμα αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας ECL A και ECL B (σε αναλογία 1:1) στο σκοτάδι και σε RT. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες με κυρίαρχο την ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται σε διάλυμα εμφάνισης (Developer) για 1 λεπτό. Ξεπλένεται σε με νερό και μονιμοποιείται σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για 1 λεπτό. Τέλος ξεπλένεται πάλι με το νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

## 2.11 Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry – ICC)

Η ανοσοκυτταροχημεία (ICC) είναι μια τεχνική εντοπισμού και απεικόνισης πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε κύτταρα, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, τα οποία δεσμεύονται στην πρωτεΐνη-στόχο. Το αντίσωμα συνδέεται ομοιοπολικά με ένα μόριο-αναφοράς, (π.χ. φθοροφόρο, φθορίζουσα χρωστική ή ένζυμο). Το μόριο αναφοράς, υπό κατάλληλες συνθήκες, θα δημιουργήσει ένα σήμα, (π.χ. φθορισμό ή χρώμα από μια ενζυμική αντίδραση), το οποίο στη συνέχεια ανιχνεύεται με μικροσκόπιο φθορισμού. Ο τύπος του μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται για την λήψη εικόνων εξαρτάται από τον τύπο του μορίου αναφοράς. Η ICC εφαρμόζεται σε καλλιέργειες κυττάρων, σε αντίθεση με την ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry –IHC), η οποία εφαρμόζεται σε μείγμα διαφορετικών κυττάρων,

καθώς αποτελούν μέρος από έναν ιστό. Η μέθοδος της ICC, εκτελείται σε πέντε στάδια: την καλλιέργεια των κυττάρων σε ειδικές γυάλινες καλυπτρίδες (coverslips), την μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων, τη σήμανση της επιθυμητής πρωτεΐνης κατά τη επώαση του παρασκευάσματος με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης, τη σήμανση του πρώτου αντισώματος με ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο φέρει ένα μόριο-αναφοράς (φθορίζουσα χρωστική) και τέλος την εξέταση του δείγματος στο μικροσκόπιο.

Καταρχάς, οι καλυπτρίδες αποστειρώνονται και τοποθετούνται στις αντίστοιχες πλάκες φρεατίων (well plates) σε αποστειρωμένες συνθήκες (σε Laminar Flow Hood). Έτσι, coverslips διαμέτρου 13mm ή 15mm τοποθετούνται σε αντίστοιχα φρεάτια ενός 24 well plate. Έπειτα, ο επιθυμητός τύπος και αριθμός των κυττάρων καλλιεργούνται πάνω στην επιφάνεια των καλυπτρίδων, εντός των φρεατίων του επιθυμητού αριθμού θέσεων.

Πριν τη συλλογή των καλυπτρίδων, πραγματοποιείται και η σήμανση των πυρήνων και/ή των μιτοχονδρίων. Η σήμανση των πυρήνων γίνεται με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής Hoescht 33258 (1 µg/ml), η οποία προσδένεται στην μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA και προσδίδει τη χαρακτηριστική κυανή χρώση στον πυρήνα των κυττάρων. Αντίστοιχα, η σήμανση των μιτοχονδρίων γίνεται με τη χρήση του MitoTracker Red CMX (100 nM), το οποίο εισέρχεται αποκλειστικά σε λειτουργικά μιτοχόνδρια και προσδίδει ένα χαρακτηριστικό ερυθρό χρώμα στα μιτοχόνδρια. Και οι δυο ουσίες προστίθενται στο καλλιεργητικό υλικό ζωντανών κυττάρων, πριν τη συλλογή και τη μονιμοποίηση αυτών.

Μετά το πέρας της κατεργασίας των κυττάρων και τη καθήλωσή τους, πραγματοποιείται η μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων στην επιφάνεια των καλυπτρίδων που αποσκοπεί στη διατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας και δομής, την προστασία από την αυτολύση των κυττάρων από πρωτεολυτικά ένζυμα αλλά και την διατήρηση της αντιγονικότητας των μορίων στόχων. Ένας τρόπος μονιμοποίησης των κυττάρων που εφαρμόστηκε στη παρούσα διατριβή είναι και η χρήση οργανικών διαλυτών. Οι καλυπτρίδες, οι οποίες φέρουν τα επιθυμητά κύτταρα, επωάζονται για 10 λεπτά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  με κρύα μεθανόλη και μετά για 2 λεπτό με κρύα ακετόνη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Να σημειωθεί ότι οι οργανικοί διαλύτες βοηθάν και στη καλύτερη διαπερατότητα των κυττάρων, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η πρόσβαση του αντισώματος στο αντιγόνο. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS, για την απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών.

Η προσθήκη του πρώτου αντισώματος (ειδικού έναντι της πρωτεΐνης-στόχου) γίνεται σε διάλυμα PBST, καθώς η παρουσία του απορρυπαντικού Tween 20 (στο PBST) ενισχύει την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών των κυττάρων και εμποδίζει τι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Η επώαση του αντισώματος με τα υπό μελέτη παρασκευάσματα διαρκεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιούνται

εκπλύσεις με το διάλυμα PBS και εν συνεχεία προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με το πρώτο αντίσωμα και το οποίο σημαίνεται με το μόριο-αναφοράς. Η επώαση του αντισώματος γίνεται σε διάλυμα PBST, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιούνται, εκ νέου, εκπλύσεις με διάλυμα PBS, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος.

Οι καλυπτρίδες επιστρώνονται με το κατάλληλο μέσο επίστρωσης και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε μέσο με βασικό συστατικό την πολυβινύλ-αλκοόλη (polyvinyl-alcohol – PVA). Η PVA σταθεροποιεί τις καλυπτρίδες πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες και ενισχύει το φθορισμό, ο οποίος προέρχεται από τον μόριο-αναφοράς του δευτέρου αντισώματος. Τα δείγματα παραμένουν στους 4°C για 24 ώρες, ώστε να σταθεροποιηθεί το PVA και μετά εξετάζονται στο μικροσκόπιο (φθορισμού). Για την λήψη εικόνων χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Image J ενώ για την επεξεργασία των εικόνων χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Q Capture.

## **2.12 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation - IP)**

Η ανοσοκατακρήμνιση (IP) αποτελεί τη μέθοδο κατακρήμνισης ενός πρωτεϊνικού αντιγόνου από ένα διάλυμα χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που δεσμεύεται ειδικά με αυτή τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο. Αυτή η διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομονωθεί και να συμπυκνωθεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Η ανοσοκατακρήμνιση είναι χρωματογραφία χημικής συγγένειας μικρής κλίμακας και κατά την ανοσοκατακρήμνιση αντίσωμα μπορεί να συζευχθεί σε ένα στερεό υπόστρωμα. Σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας αλλά και τις πρωτεωμικές αναλύσεις χρησιμοποιείται για να προσδιοριστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης-στόχου, για να μετρηθεί το μοριακό βάρος μιας δεδομένης πρωτεΐνης ή για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-νουκλεϊνικού οξέος.

Εναλλακτικά, το ελεύθερο, μη συνδεδεμένο αντίσωμα αφήνεται να σχηματίσει ανοσοσυμπλέγματα με τα κυτταρικά εκχυλίσματα (στα οποία υπάρχει και το αντιγόνο-στόχος) και στη συνέχεια τα σύμπλοκα ανακτώνται μετά τη σύνδεσή τους με τα σφαιρίδια. Αυτή η μεθοδολογία εκτέλεσης μιας ανοσοκατακρήμνισης ενδείκνυται εάν 1) η πρωτεΐνη-στόχος είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις μέσα στο διάλυμα, 2) το αντίσωμα έχει ασθενή συγγένεια δέσμευσης για το αντιγόνο.

Στη παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε η μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα, το οποίο προέκυψε ύστερα από την κλασμάτωση κυττάρων N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης του GFP και του ERβ, με σκοπό την ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ERβ στα μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας και τις πρωτεωμικές αναλύσεις.

Προετοιμασία αντισωμάτων : χρησιμοποιούμε μείγμα των σφαιριδίων σεφαρόζης (sepharose) που φέρουν την πρωτεΐνη A και σφαιρίδια που είναι συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη G. Θέλουμε συνολικά 50 μl σφαιριδίων για κάθε δείγμα. Τα σφαιρίδια φυλάσσονται σε 1V 70 % αιθανόλης. Η αιθανόλη απομακρύνεται σε πρώτη φάση με φυγοκέντρηση των σφαιριδίων για 3 λεπτά στα 2000 rpm, στους 4°C. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml RIPA buffer. Τα σφαιρίδια αναδεύονται στη ρόδα για 5 λεπτά, στους 4°C και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στα 2000 rpm, στους 4°C. Αυτό το στάδιο (της έκπλησης) επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμη.

Ακολούθως, χωρίζουμε τα σφαιρίδια σε τόσα ίσα μέρη, ανάλογα με τον αριθμό των ανοσοκατακρήμνισεων που θα πραγματοποιηθούν, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν προς ανοσοκατακρήμνιση. Επίσης, εξοικονομούνται σφαιρίδια και για το στάδιο του προ-καθαρισμού (pre-clearance), το οποίο θα περιγραφεί παρακάτω. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη των αντισωμάτων στα σφαιρίδια. Προσθέτουμε στα σφαιρίδια 2 μg αντισώματος σε διάλυμα RIPA. Προκειμένου να σχηματιστούν τα επιθυμητά σύμπλοκα, πραγματοποιείται επώαση 4 ωρών των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια υπό συνεχή ανάδευση στη ρόδα, στους 4°C.

Προετοιμασία μιτοχονδριακού εκχυλίσματος : ταυτόχρονα με την επώαση των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια (4 ώρες), προετοιμάζουμε το μιτοχονδριακό εκχύλισμα. Πρώτα, επαναδιαλυτοποιούμε το σύνολο των μιτοχονδριακών ιζημάτων σε διάλυμα RIPA (ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος). Για κάθε 1ml RIPA buffer που χρησιμοποιούμε, προσθέτουμε και 10 μl Protease Inhibitors Cocktail (Roche), 1 mM DTT και 1 mM PMSF. Έπειτα, προκαλούμε λύση και ομογενοποίηση των μιτοχονδρίων με τη χρήση υπερήχων, εφαρμόζοντας 3 σετ των 10 δευτερολέπτων (4°C) με μεσοδιάστημα ενός λεπτού.

Στη συνέχεια, προστίθεται στο εκχύλισμα, διάλυμα PBS που φέρει κι αυτό τους κατάλληλους αναστολείς πρωτεασών, όπως το RIPA. Η αναλογία όγκων των PBS και RIPA στο τελικό διάλυμα πρέπει να είναι 4:1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13000 rpm, στους 4°C και το υπερκείμενο προστίθεται στα σφαιρίδια, για επώαση μιας ώρας υπό ανάδευση, στους 4°C. Το βήμα αυτό ονομάζεται προ-καθαρισμός (pre-clearance) και πραγματοποιείται ώστε να απομακρυνθεί από το εκχύλισμα πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να συνδεθούν μη ειδικά με τα σφαιρίδια.

Μετά το τέλος του προ-καθαρισμού, το μιτοχονδριακό εκχύλισμα διαμοιράζεται ισόποσα σε κάθε erpendorf, στο οποίο υπάρχει το κατάλληλο αντίσωμα καθηλωμένο στα σφαιρίδια σεφαρόζης κι ακολουθεί επώαση 16 ωρών υπό ανάδευση, στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρούνται τα δείγματα για 4 λεπτά στα 3000 rpm, στους 4°C, ώστε να απομακρύνουμε τα συστατικά του εκχυλίσματος που δεν κατακρημνίστηκαν (unbound). Ακολουθούν 4 εκπλύσεις με PBS και στη συνέχεια, προσθέτουμε στα σφαιρίδια sample buffer. Αναδεύουμε προσεκτικά και τα θερμαίνουμε στους 95°C για 2 λεπτά. Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 2000 rpm, στους 20°C και συλλέγουμε σε νέο erpendorf το υπερκείμενο, το οποίο φέρει το σύνολο των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν. Επαναλαμβάνουμε το βήμα με το sample buffer και αφού συλλέξουμε για δεύτερη φορά το υπερκείμενο, πραγματοποιούμε μια τελευταία φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 2000 rpm, στους 20 °C, ώστε να απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα σφαιριδίων που μπορεί να συλλέχθηκαν μαζί με το υπερκείμενο.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, τα οποία συλλέχθηκαν σε SDS-PAGE, περιεκτικότητας πηκτώματος διαχωρισμού περιεκτικότητας 9% v/v σε ακρυλαμίδα, για περίπου 2 ώρες.

Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining) συμβατή με φασματομετρία μάζας: Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι μια μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών που έπεται της ηλεκτροφόρησης των πηκτών ακρυλαμιδίου και χαρακτηρίζεται από την υψηλή ευαισθησία της, τα φθηνά αναλώσιμα και την ευκολία της εφαρμογής της. Βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών να δεσμεύουν ιόντα αργύρου, με σκοπό την σήμανση και την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών πάνω στη πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή επώαζεται με το διάλυμα μονιμοποίησης για 20 λεπτά σε RT. Ακολουθούν 2 πλύσεις, των 5 λεπτών η κάθε μια, με το διάλυμα έκλυσης (washing solution), τις οποίες διαδέχονται 3 πλύσεις των 3 λεπτών με ddH<sub>2</sub>O και μια τέταρτη έκπλυση με ddH<sub>2</sub>O, στο οποίο προστέθηκαν 5 µg/ml DTT. Έπειτα, προστίθεται το διάλυμα ευαισθητοποίησης, ενώ η πηκτή βρίσκεται υπό ανάδευση. Πραγματοποιούμε 3 πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O και επωάζουμε την πηκτή για 20 λεπτά με κρύο διάλυμα χρώσης (staining solution) στους 4°C. Μετά το τέλος της επώασης, η πηκτή εκπλένεται με ddH<sub>2</sub>O δύο φορές, από ένα λεπτό κάθε φορά. Επόμενο βήμα είναι η εμφάνιση των πρωτεϊνών που σήμανε ο νιτρικός άργυρος, χρησιμοποιώντας το διάλυμα εμφάνισης (developing solution). Προσθέτουμε ορισμένη ποσότητα του διαλύματος, αναδεύουμε και ανανεώνουμε κάθε 1 λεπτό. Επαναλαμβάνουμε όσες φορές χρειαστεί και όταν εμφανιστούν οι πρωτεΐνες της πηκτής (ζώνες) σε ικανοποιητικό βαθμό, σταματάμε την αντίδραση ανίχνευσης πρωτεϊνών με το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution). Τέλος, η πηκτή αποθηκεύεται με το

διάλυμα αποθήκευσης (storing solution), το οποίο διατηρεί ενυδατωμένη τη πηκτή, στους 4°C έως τη στιγμή της ανάλυσής της με φασματομετρία μάζας.

Διάλυμα μονιμοποίησης	50% v/v μεθανόλη και 5% v/v οξικό οξύ
Διάλυμα έπλυσης	50% v/v μεθανόλη
Διάλυμα ευαισθητοποίησης	0,02% w/v sodium thiosulphate
Διάλυμα σήμανσης	0,1% w/v νιτρικό άργυρο (silver nitrate)
Διάλυμα εμφάνισης	0,04% v/v formalin και 2% w/v ανθρακικό νάτριο
Διάλυμα τερματισμού	5% v/v οξικό οξύ
Διάλυμα αποθήκευσης	1% v/v οξικό οξύ

## 2.13 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation – ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA. Κατά την πειραματική διαδικασία ακέραια κύτταρα μονιμοποιούνται με φορμαλδεΐδη, η οποία συνδέει ισχυρά και μονιμοποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA. Στη συνέχεια γίνεται θραύση του DNA σε μικρά τμήματα με τη χρήση υπερήχων. Τα ειδικά σύμπλοκα πρωτεΐνης/DNA ανοσοκατακρημνίζονται με ειδικό αντίσωμα έναντι της επιθυμητής πρωτεΐνης που προσδένεται στην αλληλουχία του DNA. Έπειτα, αναστρέφεται η σύνδεση μεταξύ πρωτεΐνης και DNA, οι πρωτεΐνες πρωτεολύονται με τη χρήση της πρωτεϊνάσης K (όπως και το RNA με τη χρήση της RNάσης A) και το DNA ελέγχεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για τον πιθανό εντοπισμό των τμημάτων του DNA, τα οποία είχαν προσδεθεί με την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Επίσης, το DNA που προκύπτει από την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης μπορεί, μετά από ειδική επεξεργασία, να αλληλουχηθεί, δίνοντας με αυτό τον τρόπο επακριβώς την αλληλουχία του DNA, η οποία αλληλεπιδρά με την υπό μελέτη πρωτεΐνη.

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για τη μελέτη της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής, εφ' όσον επιτρέπει τον εντοπισμό πρωτεϊνών της χρωματίνης, τροποποιημένες ιστόνες και μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες περιοχές DNA και σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων. Επιπλέον, επειδή οι διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA σταθεροποιούνται σε ένα ενδογενές, χρωμοσωμικό περιβάλλον, η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης απεικονίζει πλήρως και πιστά



την επίδραση της χρωμοσωμικής τοπολογίας και τη δράση των πρωτεϊνών ρύθμισης του κυττάρου. Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, σε αντίθεση με την μέθοδο ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA), αποτελεί μία *in vivo* πειραματική μέθοδος.

Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η εξής:

- 1) Κύτταρα (N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ) καλλιιεργήθηκαν σε τριβλία (dishes) διαμέτρου 150mm.
- 2) Όταν η πληρότητα (confluency) των κυττάρων στα τριβλία προσέγγιζε το 95%, πραγματοποιήθηκε η μονιμοποίηση (crosslink) των κυττάρων με τη προσθήκη 1% *v/v* φορμαλδεΐδη στο θρεπτικό μέσο και επώαση των κυττάρων στους 37°C για 10 λεπτά.
- 3) Για τον τερματισμό της διασύνδεσης, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε 125mM γλυκίνης και ακολούθησαν 2 εκπλύσεις με κρύο διάλυμα PBS.
- 4) Συλλέχθηκαν τα κύτταρα και λύθηκαν σε διάλυμα λύσης (SDS-lysis buffer) όγκου ίσου με 1ml.
- 5) Ακολούθησε η θραύση του DNA με τη χρήση υπερήχων, έτσι ώστε να δημιουργηθούν θραύσματα DNA μεγέθους μεταξύ 700pb-400pb (pair base-ζεύγη βάσεων).
- 6) Μια μικρή ποσότητα (όγκου ίσου με το 1/20 του συνολικού κυτταρικού εκχυλίσματος) επώαστηκε με 0,2M NaCl στους 65°C για 4 ώρες και ακολούθησε πέψη με RNάση A και Πρωτεϊνάση K για 1 ώρα στους 45 °C, απομόνωση του DNA με τη μέθοδο Φαινόλης/Χλωροφόρμιου και ανάλυση του DNA σε gel αгарόζης 1% *w/v* (0,4g αгарόζης σε 40 ml διαλύματος TAE με 4 μl χρωστικής Midori Green), έτσι ώστε να αξιολογηθούν τα θραύσματα DNA, τα οποία προέκυψαν από το sonication. Αν τα θραύσματα είναι μεγαλύτερα επαναλαμβάνουμε τη θραύση με τη χρήση υπερήχων αλλά και τη διαδικασία που μόλις περιγράφηκε.
- 7) Το υπόλοιπο δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 13000 rpm στους 4°C.
- 8) Το υπερκείμενο συλλέγεται και αραιώνεται 10 φορές με διάλυμα ChIP dilution (σε αυτό το βήμα αποθηκεύουμε και το 1/10 του όγκου του κυτταρικού εκχυλίσματος (input), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση των τελικών αποτελεσμάτων).
- 9) Ακολουθεί προ-καθαρισμός (pre-clearance) των δειγμάτων μας, δηλαδή επώαση του κυτταρικού εκχυλίσματος, για 1 ώρα στους 4°C υπό ανάδευση, με σφαιρίδια αгарόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A.

- 10) Ακολουθεί φυγοκέντρωση 10 λεπτών στα 3000 rpm στους 4°C, συλλογή του υπερκείμενου και επώαση του υποκείμενου με το αντίσωμα τόσο έναντι της GFP όσο και με αντίσωμα έναντι του ERβ για 16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση.
  - 11) Στο κυτταρικό εκχύλισμα, το οποίο έχει πλέον και το επιθυμητό αντίσωμα, προστίθενται σφαιρίδια αгарόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση.
  - 12) Φυγοκεντρείται το δείγμα (1000 rpm για 1 λεπτό στους 4°C) και αφαιρείται το υπερκείμενο.
  - 13) Το ίζημα, το οποίο φέρει το σύμπλοκο σφαιριδίων αгарόζης/αντίσωμα/πρωτεϊνικό σύμπλοκο-στόχος εκπλένεται-επωάζεται διαδοχικά με 1 ml με τα διαλύματα χαμηλής συγκέντρωσης άλατος, υψηλής συγκέντρωσης άλατος, διάλυμα χλωριούχου λιθίου και διάλυμα TE (Low salt, High salt, LiCl και TE), διαδοχικά (κάθε επώαση διαρκεί 10 λεπτά, υπό ανάδευση και στο τέλος κάθε έκπλυσης ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 1000 rpm για 1 λεπτό στους 4°C).
  - 14) Ακολουθεί η έκλυση (elution) των συμπλόκων-στόχων με τη επώαση του συμπλόκου σφαιριδίων αгарόζης/αντίσωμα/πρωτεϊνικό σύμπλοκο-στόχος με 250 μl διαλύματος συλλογής (elution buffer) για 15 λεπτά σε RT, φυγοκέντρωση στα 1000 rpm για 1 λεπτό και συλλογή του υπερκείμενου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά.
  - 15) Για την ανάκτηση του DNA: τα δείγματα μας (αλλά και τα inputs) επωάζονται με 0,2M NaCl για 16 ώρες στους 65°C. Ακολουθεί προσθήκη 1mM EDTA, 1mM Tris-HCl, pH=6,5, RNάση A και Πρωτεϊνάση K και επώαση στους 55°C για 3 ώρες. Με τη μέθοδο Φαινόλης/Χλωροφόρμιου απομονώνεται το DNA.
- Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύσταση των διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ChIP:

Διάλυμα λύσης SDS	Διάλυμα διαλυτοποίησης της ChIP	Διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων	Διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων	Διάλυμα χλωριούχου λιθίου	Διάλυμα TE	Διάλυμα έκλυσης
1% SDS	1% Triton X-100	1% SDS	0,1% SDS	0,25M LiCl	1mM EDTA	1% SDS
10mM EDTA	2mM EDTA	1% Triton X-100	1% Triton X-100	1% NP-40	10mM Tris-	0,1M NaHCO <sub>3</sub>

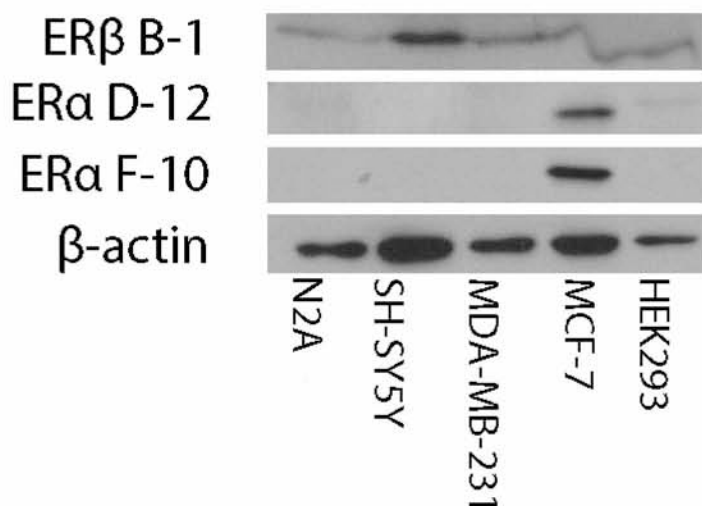
							HCl pH=8
50mM Tris- HCl pH=8	150mM NaCl	2mM EDTA		2mM EDTA		1% Deoxycholate	
	20mM HCl pH=8	Tris-	20mM HCl pH=8	Tris-	20mM HCl pH=8	Tris-	1mM EDTA
			150mM NaCl	500mM NaCl		10mM Tris- HCl pH=8	

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων σε καρκινικές σειρές κυττάρων μαστού και νευροβλαστώματος

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MCF-7 (ERα-θετικά κύτταρα) και MDA-MB-231 (ERα-αρνητικά κύτταρα), τα ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα HEK293, καθώς και οι νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές N2A (κύτταρα ποντικού) και SH-SY5Y (ανθρώπινα κύτταρα), με σκοπό α) τη διερεύνηση της πιθανής οιστρογονικής δράσης ενώσεων αργιλίου και συγκεκριμένα του χλωροϋδρικού αργιλίου (aluminum chlorohydrate - ACH) σε κύτταρα του μαστού και σε νευρικά κύτταρα, καθώς και β) τη διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα των οιστρογόνων (mtERβ). Αρχικά μελετήθηκαν, τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης των δυο ισομορφών των υποδοχέων των οιστρογόνων (ERα και ERβ) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυτταρικών αυτών σειρών εφαρμόζοντας τη μέθοδο Western blot. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1**.

Χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα παρατηρούμε ότι, σε κύτταρα MCF-7 εντοπίζονται υψηλά επίπεδα ERα, όπως και αναμενόταν. Αντίστοιχα, όλες οι κυτταρικές σειρές εκφράζουν τον ERβ σε χαμηλά επίπεδα, με εξαίρεση τα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία εκφράζουν μεγάλες ποσότητες του ERβ, ενδογενώς. Έτσι, επιλέχθηκαν τα κύτταρα MCF-7 για τη μελέτη της πιθανής επίδρασης των αλάτων του αργιλίου (π.χ. ACH) στην ERα-εξαρτώμενη οιστρογονική σηματοδότηση. Αντίστοιχες μελέτες πραγματοποιήθηκαν και σε ERα αρνητικά κύτταρα MDA-MB-231, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα μάρτυρες (control). Αντίστοιχα, για τη μελέτη της πιθανής επίδρασης του ACH στην ERβ εξαρτώμενη οιστρογονική σηματοδότηση νευρικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν κυρίως τα κύτταρα SH-SY5Y αλλά και τα κύτταρα N2A, τα οποία επιπλέον λόγω της υψηλής δεκτικότητάς τους σε πειράματα διαμόλυνσης με εξωγενή πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία πληθυσμών κυττάρων που υπερεκφράζουν σταθερά τον ERβ υποδοχέα με μιτοχονδριακή στόχευση και την αξιοποίησή τους σε μελέτες διερεύνησης του ρόλου του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια.



**Εικόνα 1.** Χαρακτηρισμός της έκφρασης των ERα και ERβ στις κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231, HEK293, N2A και SH-SY5Y : Η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ERs επιτεύχθηκε με Western blot ανάλυση των επιπέδων του ERα (αντίσωμα F-10 και D-12), του ERβ (αντίσωμα B-1) και της πρωτεΐνης της β-ακτίνης, σε ολικά εκχυλίσματα των προαναφερθέντων κυττάρων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων συνεκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4).

## 3.2 Μελέτη της εμπλοκής αλάτων αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση κυττάρων μαστού και νευρικών κυττάρων

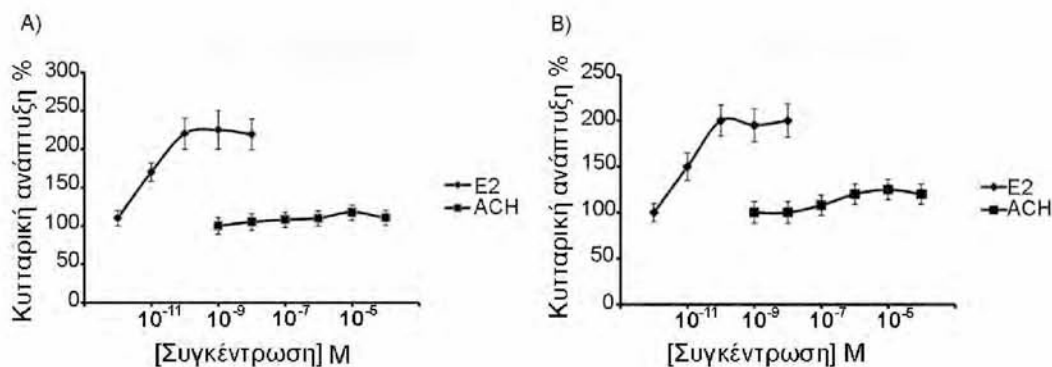
### 3.2.A Μελέτη της οιστρογονικής δράσης του ACH σε καρκινικά κύτταρα του μαστού

#### 3.2.A.1 Μελέτη της επίδρασης του ACH στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού

Διερευνώντας την επίδραση του ACH στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων του μαστού και λαμβάνοντας υπόψη ότι η οιστρογονική σηματοδότηση αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον ER-εξαρτώμενο καρκίνο του μαστού, μελετήθηκε η επίδραση του ACH στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων

MCF-7. Έτσι, κύτταρα MCF-7 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών για 48 ώρες και στην συνέχεια επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις E2 ή ACH για τρεις και πέντε ημέρες. Η πιθανή επίδρασή των ουσιών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε με εφαρμογή της δοκιμασίας XTT. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην **Εικόνα 2**.

Όπως παρατηρούμαι, η E2 επάγει (περίπου 200%) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, γεγονός που ήταν αναμενόμενο, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του  $10^{-11}$  M, επιτυγχάνοντας τη μέγιστη δυνατή επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του  $10^{-10}$  M. Αντίθετα, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ACH (από  $10^{-8}$  M έως  $10^{-4}$  M), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7.



**Εικόνα 2.** Επίδραση της E2 και του ACH στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7: κύτταρα MCF-7 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, σε 96 well plate για 2 μέρες.. Ακολούθησε η κατεργασία τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις E2 (από  $10^{-12}$  M έως  $10^{-8}$  M) και ACH (από  $10^{-8}$  M έως  $10^{-4}$  M) για A) 3 μέρες και B) για 5 μέρες. Η μεταβολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκε με την μέθοδο XTT. Τα κύτταρα αναφοράς (control) υποβλήθηκαν σε κατεργασία με ίσο όγκο ddH<sub>2</sub>O και EtOH (1:1000). Η % επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκε σε σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανερέθιστων κυττάρων μαρτύρων.

### 3.2.A.2 Διερεύνηση της επίδρασης του ACH στην μεταγραφική ενεργότητα των υποδοχέων οιστρογόνων

Με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής οιστρογονικής δράσης του αργιλίου σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα του ERα παρουσία και απουσία του ACH. Συγκριτική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινα, καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7. Για τον σκοπό αυτό προσδιορίστηκε η επίδραση αυξανόμενων



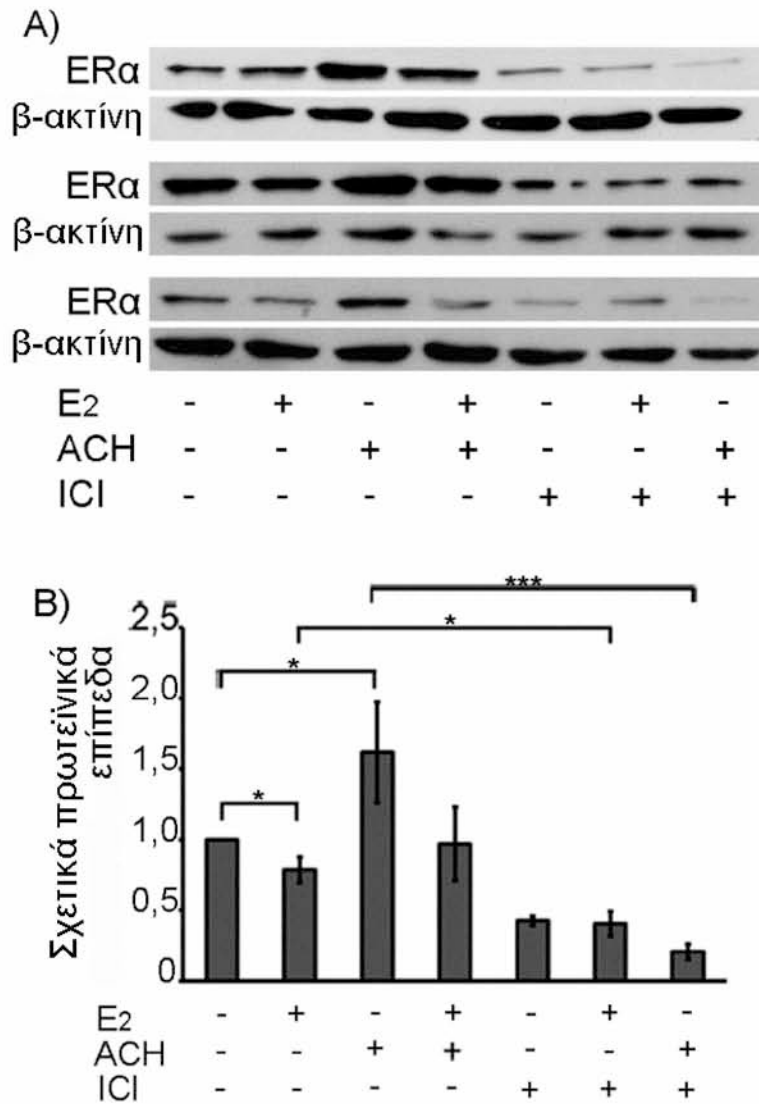




### 3.2.A.3 Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα

Δεδομένου ότι, όπως περιγράφεται στην Εισαγωγή (Ενότητα 1.8), αλλά και όπως παρατηρήθηκε στα Αποτελέσματα (Ενότητα 3.1.A.2), το ACH επάγει οριακά (10-20% αύξηση) την οιστρογονική ενεργότητα των ERs, μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERα, άρα και η πιθανή εμπλοκή του στην οιστρογονική σηματοδότηση. Η επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα εξετάστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου ανασοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων MCF-7, τα οποία επωάστηκαν με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI ή και σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων, για 4 ημέρες.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4A** και **4B**, το ACH επάγει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα (50% αύξηση), ενώ η E2 προκάλεσε μέτρια (της τάξης του 20%) μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης ERα. Παρουσία του ανταγωνιστή των οιστρογόνων, ICI 182.780, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του ERα σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (control), όπως ήταν αναμενόμενο.



**Εικόνα 4.** Αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα, υπό την επίδραση του ACH, σε κύτταρα MCF-7: A. Η αξιολόγηση της επίδρασης ACH στα επίπεδα της πρωτεΐνης ERα επιτεύχθηκε με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western των επιπέδων ERα (αντίσωμα G20) και της πρωτεΐνης της β-ακτίνης, σε ολικά εκχυλίσματα από ERα θετικά καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, τα οποία υπέστησαν κατεργασία με  $10^{-4}$ M ACH,  $10^{-9}$ M E2,  $10^{-7}$ M ICI αλλά και σε συνδυασμό αυτών, όπως υποδεικνύεται, σε μέσο απουσία ορμονών, για 4 ημέρες. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων συνεκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4) B. Κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων ERα έναντι των επιπέδων πρωτεΐνης β-ακτίνης. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (control).

#### *3.2.A.4 Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων-στόχων των ERs*

Με σκοπό να διερευνηθεί εάν οι από ACH-επαγόμενες μεταβολές στα επίπεδα ERα συνεπάγονται μεταβολές και στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων, των οποίων η έκφραση τους υπόκειται υπό τον έλεγχο της οιστρογονικής σηματοδότησης, μελετήθηκε η επίδραση ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες ERβ, p53 και c-myc. Η έκφραση του c-myc υπόκειται σε οιστρογονική ρύθμιση τόσο μέσω των άμεσων όσο και μέσω των έμμεσων γενωμικών μηχανισμών των ERs (Wang et al., 2011) και αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα στη δημιουργία αλλά και στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού (Wang et al., 2011). Αντίστοιχα, η έκφραση του p53, επίσης, υπόκειται σε οιστρογονική ρύθμιση και η έκφραση του αποτελεί ένα κομβικό σημείο ελέγχου στην δημιουργία και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (Berger et al., 2013). Κατά την αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα ERβ και μορίων-στόχων του υποδοχέα οιστρογόνων που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι η E2 προκάλεσε αύξηση της πρωτεΐνης p53 και της πρωτεΐνης c-myc σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπως και αναμενόταν. Παρουσία του ICI, η ACH-επαγόμενη αύξηση αναιρέθηκε, επαληθεύοντας, έτσι, την εμπλοκή του υποδοχέα οιστρογόνων σε αυτή τη διαδικασία (**Εικόνα 5A**). Το ACH προκάλεσε σχετική αύξηση (40%) στη σύνθεση της πρωτεΐνης p53, ενώ δεν μετέβαλε τα επίπεδα της πρωτεΐνης c-myc, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Επίσης, παρατηρήθηκε η αθροιστική δράση του ACH στην E2-επαγόμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p53. Όσον αφορά τον ERβ, παρουσία του ACH δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά του επίπεδα, τόσο στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και όσο και στα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231. Τέλος, δεδομένου ότι στα ERα-αρνητικά καρκινικά κύτταρα του μαστού, MDA-MB-231 δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση στην έκφραση της p53, παρουσία ACH, επαληθεύτηκε η εμπλοκή του ERα στην ACH-επαγόμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p53 (**Εικόνα 5B**).



**Εικόνα 5.** Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων, η έκφραση των οποίων υπόκειται σε οιστρογονική ρύθμιση, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και MDA-MB-231: πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τις πρωτεΐνες ERβ (αντίσωμα H-150), p53, c-myc και β-ακτίνης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα MCF-7 (Α) και MDA-MB-231 (Β) κυττάρων, τα οποία επώαστηκαν με ACH ( $10^{-4}$ M), E2 ( $10^{-9}$ M), ICI ( $10^{-7}$ M) αλλά και σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων, σε θεραπευτικό μέσο απουσία ορμονών, για 4 μέρες. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4). Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων συνεκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης. Κανονικοποίηση των επιπέδων των υπό μελέτη πρωτεϊνών έναντι αυτών β-ακτίνης, σε κύτταρα MCF-7 (Γ) και MDA-MB-231 (Δ), \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (control).

### 3.2.A.5 Επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA του ERα και γονιδίων στόχων των υποδοχέων οιστρογόνων

Δεδομένου ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα μεταβάλλονται παρουσία του ACH και δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση του ACH στην μεταγραφική ενεργότητα των ERs μέσω της κλασικής άμεσης γενωμικής οδού (EREs), επιλέχθηκε να μελετηθούν μεταβολές στα επίπεδα mRNA των μορίων ERα, p53, κυκλίνη D1, c-fos και c-myc, των οποίων η έκφραση υπόκειται υπό τον έλεγχο οιστρογονικής σηματοδότησης, μέσω των μη κλασικών, έμμεσων γενωμικών δράσεων των οιστρογόνων (Sp1, Ap-1, CREs) (Wang et al., 2011; Berger et al., 2013; Bjornstrom & Sjoberg, 2005). Επίσης τα μόρια αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Για τον σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA των προαναφερθέντων μορίων, υπό συνθήκες 2 και 6 ωρών επώασης των κυττάρων MCF-7 με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH ή  $10^{-7}$  M ICI ή και σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων, με εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR και με τη χρήση ειδικών εκκινητών όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 6**.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6Α**, μετά από την δίωρη κατεργασία των κυττάρων MCF-7, η E2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA της κυκλίνης D1 και του c-fos, περίπου 2,5 και 3,5 φορές αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα μη-κατεργασμένα κύτταρα ελέγχου. Ομοίως, το ACH προκάλεσε περισσότερο από 1,5 φορές αύξηση των επιπέδων mRNA της κυκλίνης D1 και του c-fos, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Η αύξηση αυτή των επιπέδων mRNA διατηρείται και παρουσία E2 σε συνδυασμό με το ACH, ενώ μείωση παρατηρήθηκε σε κύτταρα που επώαστηκαν είτε με E2 είτε με ACH σε συνδυασμό με ICI, ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί ένα γνωστό ανταγωνιστή του ERα. Επίσης μετά από επώαση των κυττάρων για 2 ή 6 ώρες με E2 σε συνδυασμό με το ACH παρατηρήθηκε διπλασιασμός των επιπέδων mRNA του ERα και του p53, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 6Β**).









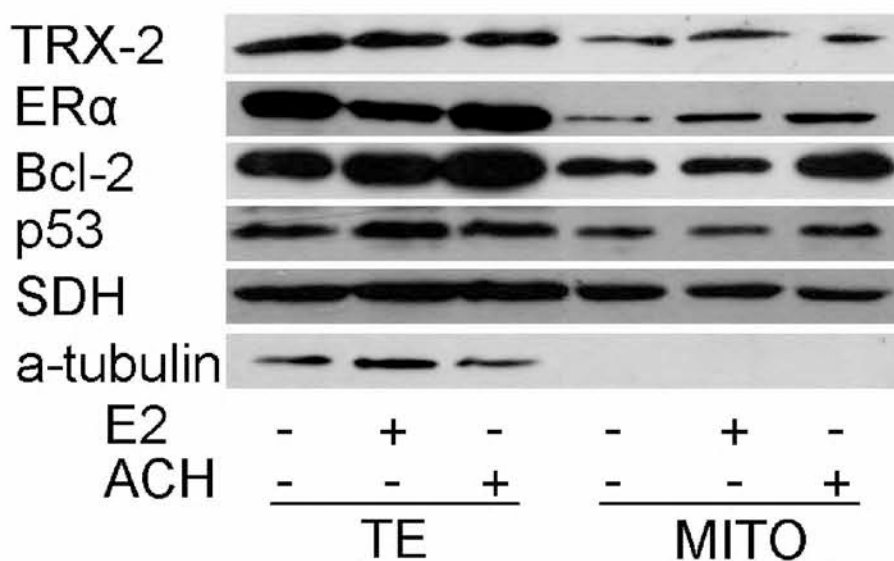
**Εικόνα 7.** Επίδραση του ACH στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ERs σε καρκινικά κύτταρα του μαστού: το ACH επάγει τον περιπυρηνικό εντοπισμό του ERβ σε καρκινικά κύτταρα μαστού, MCF-7 (B) και MDA-MB-231 (Γ), ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τον περιπυρηνικό εντοπισμό του ERα σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 (Α), τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε μέσο απουσία ορμονών για 48 ώρες και επωάστηκαν περαιτέρω με  $10^{-4}$ M ACH ή/και  $10^{-9}$ M E2 σε θρεπτικό μέσο DMEM απουσία ορμονών και παρουσία 200 nM CMX (μιτοχονδριακός φθορίζων ιχνηθέτης). Τα κύτταρα ελέγχου (control) υποβλήθηκαν σε κατεργασία με ddH2O και EtOH στην ίδια αραίωση όπως τα κατεργασμένα (με E2 και ACH) κύτταρα. Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων σε μεθανόλη-ακετόνη, ακολούθησε ανοσοκυτταροχημική μελέτη εντοπισμού των ERs με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων έναντι του ERβ (H150, Santa Cruz) (B, Γ), του ERα (ERα-G20, Santa Cruz) (A) και anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (αντισώματα σημασμένα με πράσινη φθορίζουσα). Χρησιμοποιήθηκε επίσης η χρωστική Hoechst 33342 (μπλε) για τη σήμανση των πυρήνων. Οι μπάρες των εικόνων αντιστοιχούν σε 50 μm. Η ποσοτικοποίηση του πυρηνικού και περιπυρηνικού-μιτοχονδριακού εντοπισμού του ERα (Δ) σε κύτταρα MCF-7 και του περιπυρηνικού-μιτοχονδριακού εντοπισμού του ERβ (Ε) σε κύτταρα που έχουν υποστεί κατεργασία με E2- ή ACH, εκφράζεται ως η σχετική πυκνότητα φθορισμού ανά μονάδα επιφάνειας σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.D. ( $n > 50$ ), \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (control).

### ***3.2.A.7 Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μιτοχονδριακών μορίων που υπόκεινται σε ρύθμιση από την οιστρογονική σηματοδότηση***

Λαμβάνοντας υπόψη τον περιπυρηνικό εντοπισμό των μιτοχονδρίων σε πολλά είδη κυττάρων (Okatsu et al. 2010) αλλά και την ACH-επαγόμενη αύξηση του περιπυρηνικού εντοπισμού των υποδοχέων των οιστρογόνων, επιχειρήθηκε η αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στα επίπεδα έκφρασης μιτοχονδριακών μορίων, τα όποια ελέγχουν μιτοχονδριακές λειτουργίες και υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση. Έτσι, αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERα, p53 και Bcl-2, παρουσία ACH, τόσο σε ολικά όσο και σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα κυττάρων MCF-7, τα οποία επωάστηκαν με  $10^{-9}$ M E2 και/ή  $10^{-4}$ M ACH. Η εκτίμηση των επιπέδων της α-τουμπουλίνη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της πιθανής πρόσμειξης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στα μιτοχονδριακά κλάσματα καθώς και για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ολικών εκχυλισμάτων. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH), που αποτελεί ένα ένζυμο του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και συστατικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, αναλύθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες p53 και Bcl-2 μελετήθηκαν, καθώς α) η έκφραση τους ρυθμίζεται από την οιστρογονική σηματοδότηση (Berger et al., 2012; Marino et al., 2007), β) αμφότερες εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια (Lee et al., 2008) και γ) αποτελούν σημαντικά μόρια για τη

δημιουργία και την ανάπτυξη του καρκίνου, δεδομένου ότι ρυθμίζουν αποπτωτικούς μηχανισμούς (Linjawy et al. 1999). Η πρωτεΐνη TRX-2 μελετήθηκε καθώς αποτελεί μια κατεξοχήν μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου, άρα και στην ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του ERα (Rao et al., 2009).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8**, παρατηρήθηκε σχετική αύξηση στα μιτοχονδριακά αλλά και στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του Bcl-2 παρουσία ACH. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι το ACH, αλλά και η E2 σε μικρότερο βαθμό, οδηγεί σε αύξηση του μιτοχονδριακού εντοπισμού του ERα. Η παρατήρηση αυτή δεν εξακριβώθηκε με τη χρήση της μεθόδου της ανοσοκυτταροχημείας, πιθανόν λόγω του ότι η ανοσοκυτταροχημεία δεν αποτελεί μια ποσοτική μέθοδο. Αντίθετα, δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης θειορεδοξίνης (TRX-2) και της p53, τόσο σε επίπεδο ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος όσο και σε επίπεδο μιτοχονδρίων, παρουσία ACH ή E2.



**Εικόνα 8.** Επίδραση του ACH στα επίπεδα των μιτοχονδριακών TRX-2, ERα, p53, και Bcl-2: Εφαρμόστηκε η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western των μορίων ERα (αντίσωμα G20) (A), TRX-2, Bcl-2, p53 (B), SDH σε ολικά (TE) και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα (MITO) από κύτταρα MCF-7, τα οποία είχαν επωαστεί 4 μέρες με  $10^{-4}$  M ACH ή  $10^{-9}$  M E2. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4). Η SDH και η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών των μιτοχονδριακών κλασμάτων και των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, αντίστοιχα. Η μη ύπαρξη α-τουμπουλίνης στο

μιτοχονδριακό κλάσμα υποδεικνύει και την απουσία πρόσμειξης κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών σε αυτό.

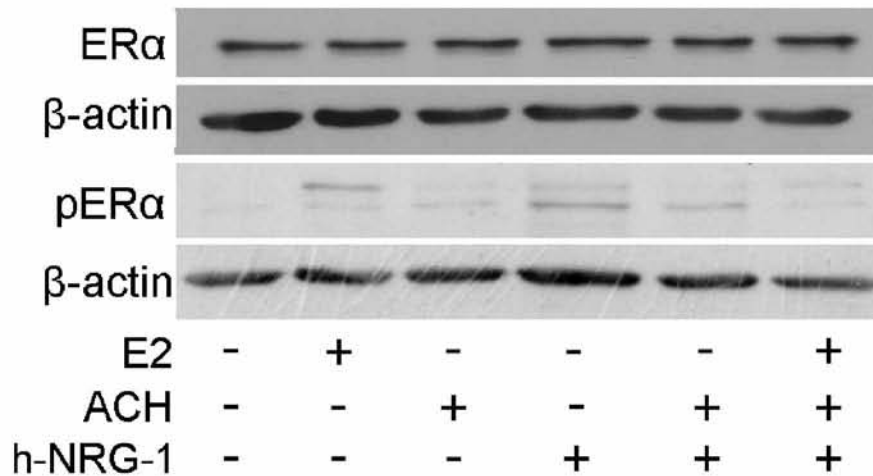
### *3.2.A.8 Έλεγχος της επίδρασης του ACH στους μηχανισμούς αποικοδόμησης του ERα*

Όπως παρατηρήθηκε, (Αποτελέσματα, 3.1.A.3), κατά την επώαση των κυττάρων MCF-7 με  $10^{-4}$  M ACH αυξήθηκαν σημαντικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα, χωρίς όμως να αυξάνονται και αντίστοιχα τα επίπεδα mRNA του ERα στις ίδιες συνθήκες (Αποτελέσματα, 3.1.A.5). Γνωρίζοντας επίσης ότι τα μεταλλοιστρογόνα αλληλεπιδρούν με διάφορα αμινοξέα των πρωτεϊνών-στόχων τους, (επεμβαίνοντας στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και μεταβάλλοντας έτσι τη δραστικότητα των πρωτεϊνών αυτών) σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση της Ser118 του ERα αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό ελέγχου της σταθερότητας του ERα, καθώς η φωσφορυλίωση του ERα στη Ser118 επάγει την ουβικουιτινίωση και συνεπώς την αποδόμησή του (Grisouard et al., 2007, Valley et al., 2005), μελετήθηκε η επίδραση του ACH στα επίπεδα φωσφορυλιωμένου ERα στην Ser118. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών και επωάστηκαν με  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-9}$  M E2, 100 μg/ml νευρογλοβίνη (Ngb) ή και με συνδυασμό αυτών των παραγόντων για 30 λεπτά. Η Ngb επάγει τη φωσφορυλίωση της Ser118 του ERα (Ascenzi et al., 2016). Η φωσφορυλίωση της Ser118 ταυτοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του φωσφορυλιωμένου (στη θέση 118) και μη, ERα, με τη μέθοδο της ανάλυσης ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην **Εικόνα 9**.

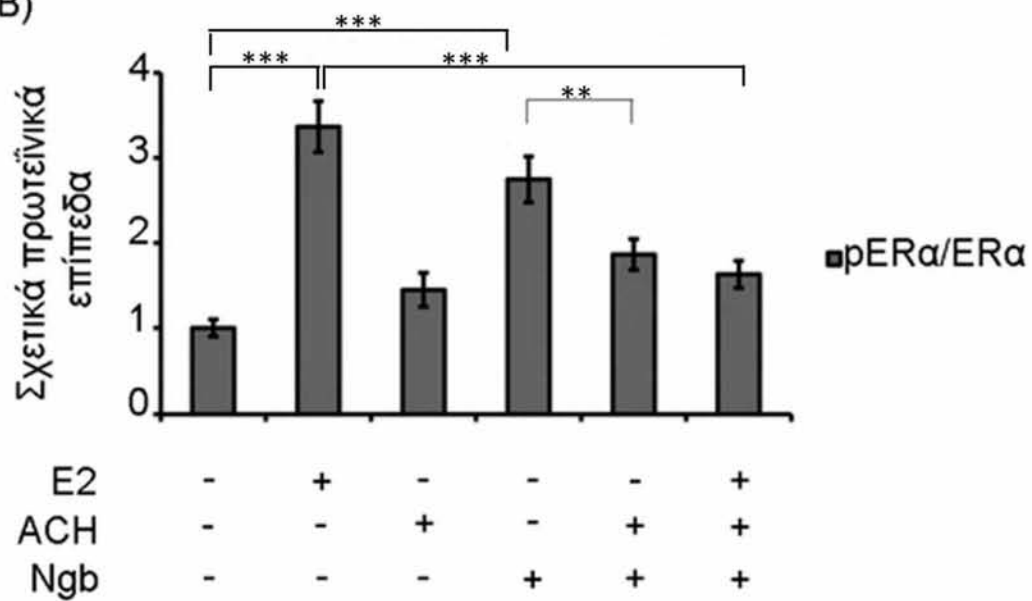
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9**, σε κύτταρα MCF-7, παρουσία τόσο της νευρογλοβίνης όσο και της E2 παρατηρείται αύξηση (περίπου 3 φορές) των πρωτεϊνικών επιπέδων, του φωσφορυλιωμένου στη Ser118, υποδοχέα των οιστρογόνων άλφα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς γνωρίζουμε ότι η φωσφορυλίωση του ERα στο κατάλοιπο της Ser118 είναι τόσο προσδετο-εξαρτώμενη (E2) όσο και μη προσδετο-εξαρτώμενη (Ngb). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δυο μπάντες που ανιχνεύονται κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western αντιπροσωπεύουν την φωσφορυλιωμένη (κάτω μπάντα) και την υπερφωσφορυλιωμένη (πάνω μπάντα) μορφή του ERα (D.Chen et al., 2002). Κατά την επώαση των κυττάρων MCF-7 με  $10^{-4}$  M ACH, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του φωσφορυλιωμένου ERα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ταυτόχρονη παρουσία του ACH είτε με Ngb είτε με την E2 οδηγεί σε μείωση (περίπου 50%) της από E2 ή Ngb παρατηρούμενης αύξησης της φωσφορυλίωσης του ERα στην S118, υποδεικνύοντας την από ACH-επαγόμενη

αναστολή της ενεργοποίησης μηχανισμών αποικοδόμησης του ERα άρα και αύξηση της σταθερότητάς του παρουσία του ACH.

A)



B)



**Εικόνα 9.** Επίδραση του ACH στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERα στη Ser118 : Α) Η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του φωσφορυλιωμένου, ERα επιτεύχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western των επιπέδων του ERα, φωσφορυλιωμένου και μη και της πρωτεΐνης της β-ακτίνης, σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων, τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών για 48 ώρες και στην συνέχεια επώαστηκαν για 30 λεπτά με  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-9}$  M E2 και με 100  $\mu\text{g/ml}$  Ngb ή και σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων συνεκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης και του υποδοχέα ERα. Β) Κανονικοποίηση των επιπέδων του φωσφορυλιωμένου ERα έναντι των επιπέδων του μη φωσφορυλιωμένου ERα. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.D. ( $n > 50$ ), \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς, όπως αποικονίζονται στην Εικόνα 9.

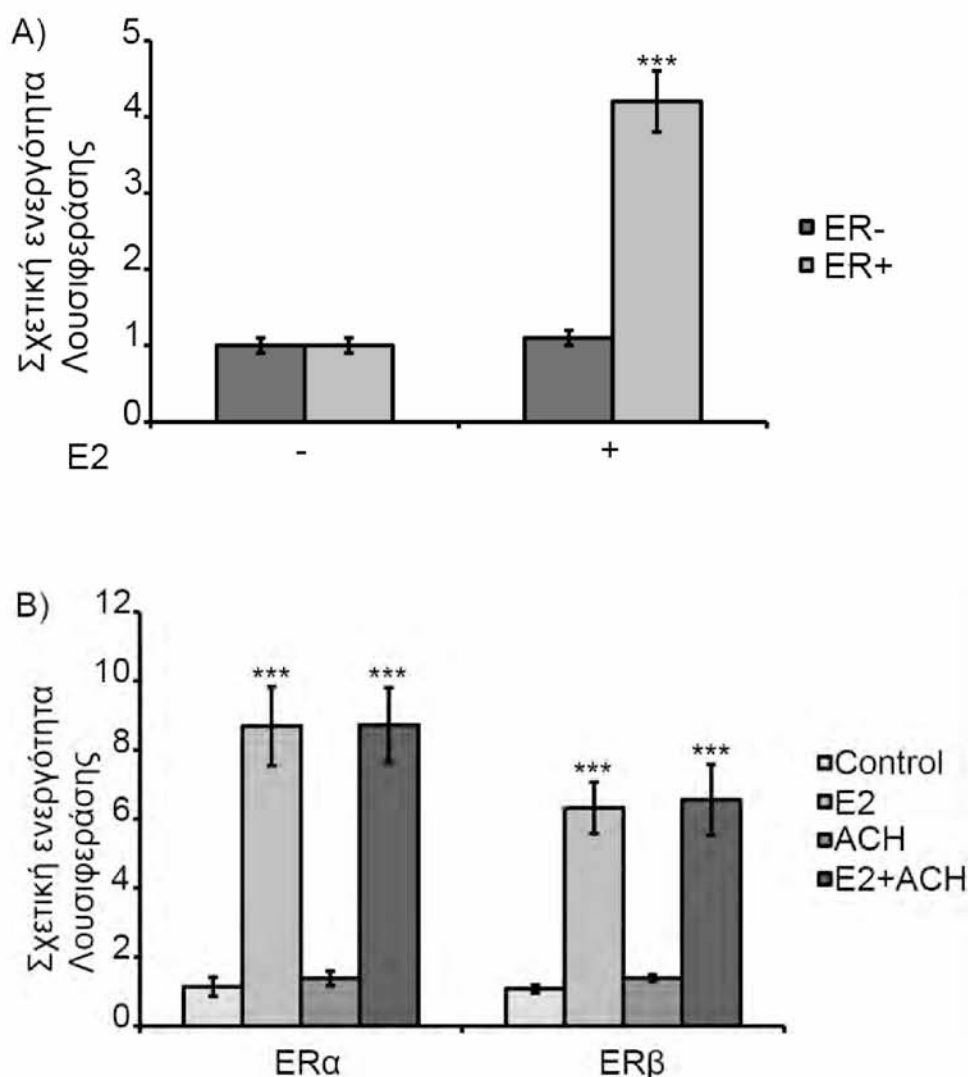
### **3.2.B Διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης του ACH σε νευρικά κύτταρα**

#### ***3.2.B.1 Έλεγχος της επίδρασης του ACH στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των ERs σε κύτταρα νευροβλαστώματος***

Δεδομένου ότι η ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των υποδοχέων των οιστρογόνων εξαρτάται και από τη παρουσία συμπαραγόντων που σχετίζεται και με τον τύπο των κυττάρων και δεδομένης τόσο της πιθανής νευροτοξικής δράσης του αργιλίου όσο και της νευροπροστατευτικής δράσης των οιστρογόνων, μελετήθηκε η επίδραση του ACH στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων των ERs σε νευρικά κύτταρα. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του ACH στη ρύθμιση της ERE εξαρτώμενης μεταγραφής γονιδίων αναφοράς ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση του ACH στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των υποδοχέων των οιστρογόνων σε νευρικά κύτταρα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα N2A, στα οποία δεν εντοπίζονται ανιχνεύσιμα επίπεδα υποδοχέων οιστρογόνων με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Αποτελέσματα, **Εικόνα 1**) και δεν παρουσιάζουν επαγωγή της ορμονο-εξαρτώμενης μεταγραφής γονιδίων αναφοράς (**Εικόνα 10A**), παραμόνο μετά τη διαμόλυνσή τους με πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν την έκφραση των ERα (**Εικόνα 10A**) και την επώασή τους με E2. Έπειτα, κύτταρα N2A, μετά την διαμόλυνσή τους με τους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς (pTK-ERE-Luc, pSV- $\beta$ -galactosidase, pGS5-ERα ή pGS5-ERβ) με τη χρήση  $\text{CaPO}_4$ , επώαστηκαν για 6 ώρες με  $10^{-4}$  M ACH ή/και  $10^{-9}$  M E2, σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, έτσι ώστε να μελετηθεί η

επίδραση του ACH στη ρύθμιση της ERE-εξαρτώμενης μεταγραφής γονιδίων αναφοράς (Εικόνα 10B). Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της δραστικότητας της λουσιφεράσης απεικονίζονται στην Εικόνα 10.

Με βάση την Εικόνα 10, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αλλαγή στην μεταγραφική ενεργότητα των δυο ισομορφών των υποδοχέων των οιστρογόνων από το ACH. Επίσης, επαληθεύεται η μη έκφραση ανιχνεύσιμων επιπέδων ενδογενών υποδοχέων των οιστρογόνων στα κύτταρα N2A.



**Εικόνα 10.** Επίδραση του ACH στην ERE- ελεγχόμενη έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης, σε νευροβλαστωματικά κύτταρα N<sub>2</sub>A. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χαμηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη και απουσία ορμονών και διαμολύνθηκαν παροδικά (A) με πλασμίδιο που έφερε την αλληλουχία ERE-luc (μόριο αναφοράς), με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (μόριο κανονικοποίησης) καθώς και (B) με τα πλασμίδια pGS5-ERα ή pGS5-ERβ, τα

οποία φέρουν τα γονίδια του ERα και του ERβ, αντίστοιχα, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα. Τα κύτταρα παρέμειναν περαιτέρω σε καλλιέργεια για 48 ώρες και ακολούθως υπέστησαν κατεργασία με Α)  $10^{-9}$  M E2 και Β)  $10^{-4}$  M ACH και / ή  $10^{-9}$  M E2, για 6 ώρες. Τα κύτταρα ελέγχου (control) υποβλήθηκαν σε κατεργασία με ίσο όγκο ddH<sub>2</sub>O και EtOH (1:1000). Μετά τη λύση των κυττάρων, μετρήθηκε η δραστικότητα της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η δραστικότητα της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκε έναντι της δραστικότητας της β-γαλακτοσιδάσης και εκφράστηκε ως σχετική ενεργότητα λουσιφεράσης. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.D (n = 6), \* P <0.05, \*\*\* P <0,001, καθώς συγκρίνονται με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (control).

### ***3.2.B.2 Επίδραση του ACH στην έκφραση ρυθμιστικών μορίων της απόπτωσης σε κύτταρα νευροβλαστώματος-Συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του ERβ***

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH στα νευρικά κύτταρα, έλαβαν χώρα μελέτες για την πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων διαφόρων μορίων, τα οποία εμπλέκονται στην απόπτωση και αποτελούν έμμεσα ή άμεσα μόρια-στόχους της οιστρογονικής σηματοδότησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όπως έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία, τα οιστρογόνα μέσω του ERβ ασκούν σημαντική νευροπροστατευτική δράση (Fiocchetti et al., 2012). Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ, αλλά και της προ-κασπάσης 3, 9 και του Bcl-2, με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων SH-SY5Y, τα οποία επώαστηκαν με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI ή και σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων, για 4 ημέρες. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 11**.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11** τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ μειώνονται παρουσία του ACH. Επίσης, κατά την κοινή χορήγηση ACH/E2 στα κύτταρα SH-SY5Y, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ μειώνονται σημαντικά (περίπου 50%) σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των κυττάρων αναφοράς, καθώς και των κατεργασθέντων με E2 κυττάρων. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3, παρατηρούμαι τη μείωσή τους παρουσία του ACH αλλά και αναίρεση αυτής της δράσης παρουσία του ACH μαζί με τον παράγοντα ICI, υποδηλώνοντας ότι, η παρατηρούμενη αύξηση της ενεργής μορφής της κασπάσης 3 μετά την κατεργασία με ACH πιθανόν να συντελείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της παρεμβολής του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση. Αντίστοιχα, παρουσία του ACH, παρατηρούμαι μικρή μείωση και στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρουσία του ACH, στα νευρικά κύτταρα επάγονται οι μιτοχονδριακά επαγόμενοι αποπτωτικοί μηχανισμοί. Τέλος, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bcl-2, όπως φαίνεται και στην



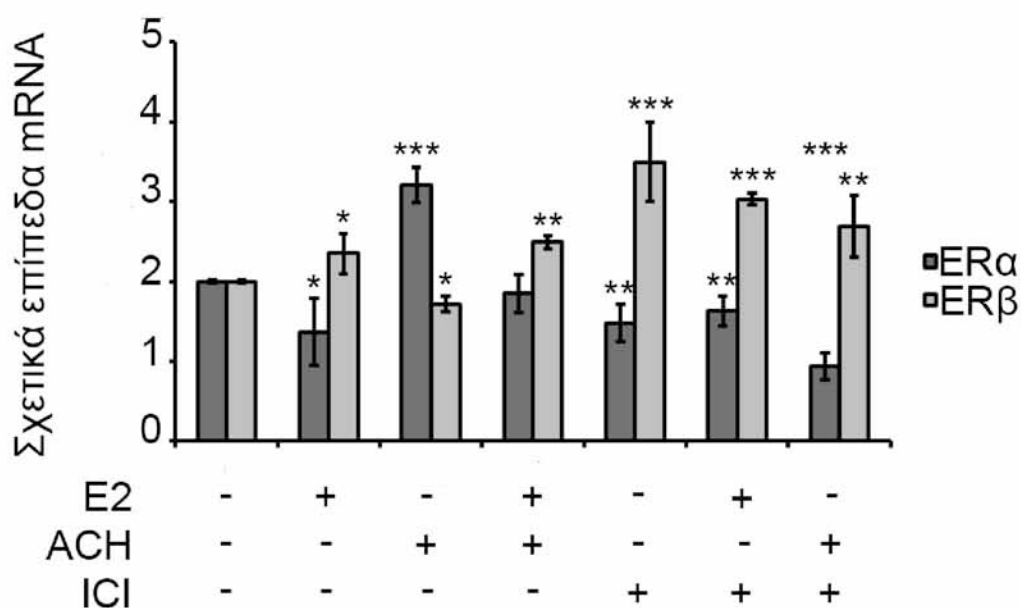


συνδυασμό αυτών, όπως υποδεικνύεται, σε θεραπευτικό μέσο απουσία ορμονών, για 4 ημέρες. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων συνεκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4) Β. Κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ έναντι των επιπέδων πρωτεΐνης β-ακτίνης. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (control).

### ***3.2.B.3 Επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA των ERα και ERβ***

Έχοντας παρατηρήσει τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, στα ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y αλλά και στα καρκινικά κύτταρα MCF-7, παρουσία του ACH, επιχειρήθηκε να αξιολογηθούν και τα επίπεδα mRNA των δυο ισομορφών του υποδοχέα των οιστρογόνων, ώστε να διαπιστωθεί εάν η μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ συμβαδίζει και με αντίστοιχες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου του ERβ. Έτσι, με εφαρμογή της μεθόδου qPCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA του ERα και του ERβ στα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία επώαστηκαν με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH ή  $10^{-7}$  M ICI ή και σε συνδυασμό αυτών των παραγόντων, για δυο ώρες, σε θεραπευτικό μέσο απουσία ορμονών. Τα αποτελέσματα της qPCR απεικονίζονται στην **Εικόνα 12**.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρούμαι διαφορεική δράση του ACH στα επίπεδα mRNA του ERα και του ERβ. Συγκεκριμένα, παρατηρούμαι μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου του ERα παρουσία της E2, ενώ αύξηση παρατηρείται στα επίπεδα mRNA του γονιδίου του ERα παρουσία του ACH και μάλιστα η δράση αυτή αναιρείται παρουσία του ICI. Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια με αυτά των αντίστοιχων μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7. Επίσης, παρατηρούμαι μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου του ERα, παρουσία του ICI, ενώ κατά την συγχρήγηση του ICI με E2, η μείωση αυτή παραμένει σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Όσο αφορά τα επίπεδα mRNA του ERβ, παρουσία της E2 παρατηρείται μικρή αύξηση των επιπέδων mRNA, ενώ παρουσία του ACH εμφανίζεται οριακή μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου του ERβ, γεγονός που συμφωνεί και με την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ στα νευρικά κύτταρα, παρουσία του ACH. Τέλος, παρουσία του παράγοντα ICI, μόνο του ή σε συγχρήγηση τόσο με ACH όσο και με E2, παρατηρούμαι σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου του ERβ.



**Εικόνα 12.** Διαφορική επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA των μορίων ERα και ERβ : Εφαρμόστηκε η μέθοδος της qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των ERα, ERβ, με τη χρήση ειδικών εκκινήτων (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 5) σε κύτταρα SH-SY5Y μετά από επώαση 2 ωρών των κυττάρων με  $10^{-9}$ M E2 και / ή  $10^{-4}$ M ACH σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ως μέση τιμή  $\pm$  S.D. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , όταν συγκρίνονται με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (control).

#### 3.2.B.4 Επίδραση του ACH στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ERβ σε νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή (Ενότητα 1.3) οι υποδοχείς των οιστρογόνων, και κυρίως ο ERβ, έχουν ανιχνευτεί στα μιτοχόνδρια, υποδηλώνοντας άμεση εμπλοκή τους στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Psarra et al., 2008; Liao et al., 2015; Kim et al., 2017). Δεδομένου, λοιπόν, της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ, του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει στους νευροπροστατευτικούς, αντιοξειδωτικούς και αποπτωτικούς μηχανισμούς, διερευνήθηκε η πιθανή οιστρογονική δράση του ACH στα νευρικά κύτταρα. Όσο αφορά την επίδραση του ACH στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ, μελετήθηκε ο μιτοχονδριακός εντοπισμός του ERβ, με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας, παρουσία και απουσία του ACH ή/και E2 σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών. Χρησιμοποιήθηκαν τα ανθρώπινα νευρικά καρκινικά κύτταρα SH-SY5Y, καθώς γνωρίζουμε



**Εικόνα 13.** Το ACH επάγει τον περιπυρηνικό εντοπισμό του ERβ σε νευροβλαστωματικά καρκινικά κύτταρα: Α) Τα κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών για 48 ώρες και στην συνέχεια επωάστηκαν για 2 ώρες με  $10^{-4}$ M ACH ή/και  $10^{-9}$ M E2 σε DMEM απουσία ορμονών παρουσία 200 nM CMX (μιτοχονδριακός φθορίζων ιχνηθέτης, κόκκινη χρώση). Τα κύτταρα ελέγχου (control) υποβλήθηκαν σε κατεργασία με ddH<sub>2</sub>O και EtOH στην ίδια αραίωση όπως τα επεξεργασμένα με E2 ή ACH κύτταρα. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και εφαρμογή της μεθόδου της ανοσοκυτταροχημείας. Κατά την ανοσοκυτταροχημεία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του ERβ (H150) και anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (πράσινη φθορίζουσα). Χρησιμοποιήθηκε επίσης η χρωστική Hoechst 33342 (μπλε) για τη χρώση πυρήνων. Β) Παρατηρήθηκε πυρηνικός και περιπυρηνικός-μιτοχονδριακός εντοπισμός του ERβ, ο οποίος εκφράζεται ως σχετική πυκνότητα φθορισμού ανά μονάδα επιφάνειας σε σύγκριση με αντίστοιχες τιμές στα κύτταρα ελέγχου. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.D. ( $n > 50$ ), \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (control).

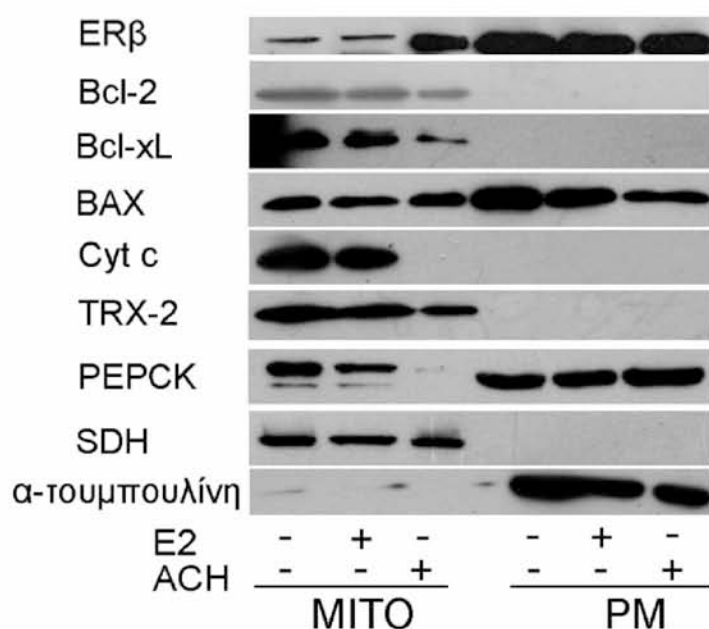
### ***3.2.B.5 Επίδραση του ACH σε επίπεδα μιτοχονδριακών μορίων που σχετίζονται με οιστρογονική σηματοδότηση***

Έχοντας υπόψη την ACH-επαγόμενη αύξηση του περιπυρηνικού εντοπισμού των υποδοχέων των οιστρογόνων και κυρίως του ERβ, επιχειρήθηκε α) η αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης του ACH στον μιτοχονδριακό εντοπισμό μορίων, τα οποία υπόκεινται άμεσα ή έμμεσα σε οιστρογονική ρύθμιση αλλά και β) η αξιολόγηση της πιθανής μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων αυτών. Έτσι, μελετήθηκε ο μιτοχονδριακός εντοπισμός των πρωτεϊνών ERβ, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, TRX-2, PEPCK και του κυτοχρώματος c, παρουσία ACH, τόσο σε κυτταροπλασματικά όσο και σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα κυττάρων SH-SY5Y, τα οποία επωάστηκαν με E2 και/ή ACH. Παράλληλα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της α-τουμουλίνης για την αξιολόγηση της μιτοχονδριακής καθαρότητας και για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ολικών εκχυλισμάτων. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH), αναλύθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.

Μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xL, Bax και κυτόχρωμα c, καθώς αφενός έχουν μιτοχονδριακή εντόπιση, αφετέρου αποτελούν σημαντικά μόρια για τη ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών. Επίσης, η έκφρασή τους υπόκειται σε ρύθμιση μέσω της οιστρογονικής σηματοδότησης, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή (Ενότητα 1.7). Η πρωτεΐνη TRX-2 μελετήθηκε καθώς αποτελεί μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου, άρα και στη ομαλή λειτουργία των νευρικών κυττάρων. Τέλος, η μιτοχονδριακή ισομορφή της πρωτεΐνης PEPCK, υπόκειται σε ρύθμιση

μέσω της οιστρογονικής σηματοδότησης και αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο της γλυκονεογέννεσης αλλά και ένα παράγοντα που επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Mendez-Lucas et al., 2014).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 14**, παρατηρούμαι μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL και μικρή αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, παρουσία του ACH στα ανθρώπινα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Δεν παρατηρείται αντίστοιχη μεταβολή στα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bax στο κυτταρόπλασμα, παρουσία του ACH, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει τη μετακίνηση της Bax από το κυτταρόπλασμα προς τα μιτοχόνδρια. Επίσης, παρουσία του ACH δεν επετεύχθηκε η ανίχνευση του κυτοχρώματος c στα μιτοχονδριακά κλάσματα των κυττάρων SH-SY5Y, υποδηλώνοντας, έτσι, την απελευθέρωσή του από τα μιτοχόνδρια. Όλα τα προαναφερθέντα, συνηγορούν στην πιθανή ACH- εξαρτώμενη επαγωγή των αποπτωτικών μηχανισμών στα νευρικά κύτταρα. Επίσης, στην **Εικόνα 14**, παρατηρούμαι μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων και της αντι-οξειδωτικής πρωτεΐνης TRX-2 αλλά και της πρωτεΐνης PEPCK, παρουσία του ACH. Τέλος, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ εμφανίζονται αυξημένα στα μιτοχόνδρια παρουσία του ACH, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της ανοσοκυτταροχημείας, όπου παρατηρείται μετακίνηση του ERβ στα μιτοχόνδρια παρουσία και του ACH.



**Εικόνα 14.** Επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που σχετίζονται με μιτοχονδριακές λειτουργίες: Α. Εφαρμόστηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για την αξιολόγηση των επιπέδων των

μορίων ERβ, TRX-2, PEPCK, Bcl-2, Bcl-XI, Bax, κυτόχρωμα c, SDH και α-τουμπουλίνης, σε εμπλουτισμένα κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα κυττάρων SH-SY5Y που είχαν υποστεί κατεργασία με ACH ή E2, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα (Υλικά & Μέθοδοι, Πίνακας 4). Η SDH και η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων των μιτοχονδριακών και των ολικών πρωτεϊνών, αντίστοιχα.

### **3.3 Διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού ERβ στα νευρικά κύτταρα**

#### **3.3.1 Κατασκευή σταθερά μετασχηματισμένων νευροβλαστωματικών κυττάρων εμπλουτισμένων ως προς την έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων βήτα με μιτοχονδριακή στόχευση**

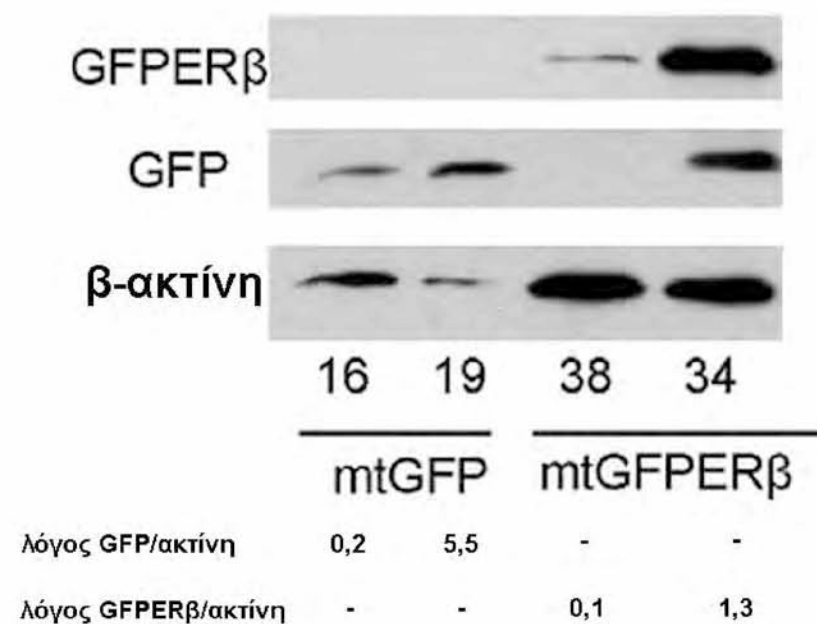
Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ) σε νευρικά κύτταρα, επιδιώξαμε τη δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων νευροβλαστώματος, τα οποία θα παρουσίαζαν υπερέκφραση της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-ERβ, η οποία θα έφερε και την αλληλουχία-οδηγό για την μιτοχονδριακή στόχευση αυτής, (mtGFP-ERβ). Παράλληλα επιχειρήθηκε η δημιουργία κυττάρων αναφοράς (control), τα οποία θα παρουσίαζαν υπερέκφραση της πρωτεΐνης GFP μαζί με την αλληλουχία-οδηγό, ώστε να εξασφαλίζετε η μιτοχονδριακή εντόπιση του μορίου.

Για την δημιουργία των μετασχηματισμένων αυτών κυττάρων, επιλέχθηκαν τα νευροβλαστωματικά κύτταρα ποντικού, N2A, τα οποία διαμολύνθηκαν, με τη χρήση της Lipofectamine 2000®, με φορείς, οι οποίοι έφεραν γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση της mtGFP-ERβ και, mtGFP, αντίστοιχα. Ακολούθησε η επώαση των κυττάρων με το αντιβιοτικό G418, έτσι ώστε να γίνει η επιλογή πληθυσμών κυττάρων εμπλουτισμένων ως προς την έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών mtGFP και mtGFP-ERβ. Συλλέχθηκαν συνολικά 50 αποικίες για τον έλεγχο των κυττάρων που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFP-ERβ και 40 αποικίες για τον έλεγχο των κυττάρων που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFP. Οι αποικίες που συλλέχθηκαν, ταυτοποιήθηκαν για την ύπαρξη των mtGFP και mtGFP-ERβ, με εφαρμογή της μεθόδου της ανοσοκυτταροχημείας και μικροσκοπίας φθορισμού, με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western καθώς και με εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR, έτσι ώστε να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη των mtGFP και mtGFP-ERβ τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA, καθώς και για να ταυτοποιηθεί ο μιτοχονδριακός εντοπισμός των εκφρασμένων πρωτεϊνών. Οι εμπλουτισμένες ως προς την υπερέκφραση των υβριδικών mtGFP και mtGFP-ERβ πρωτεϊνών αποικίες θα αναφέρονται

στο εξής ως N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων απεικονίζονται στις **Εικόνες 15, 16, 17 και 18**.

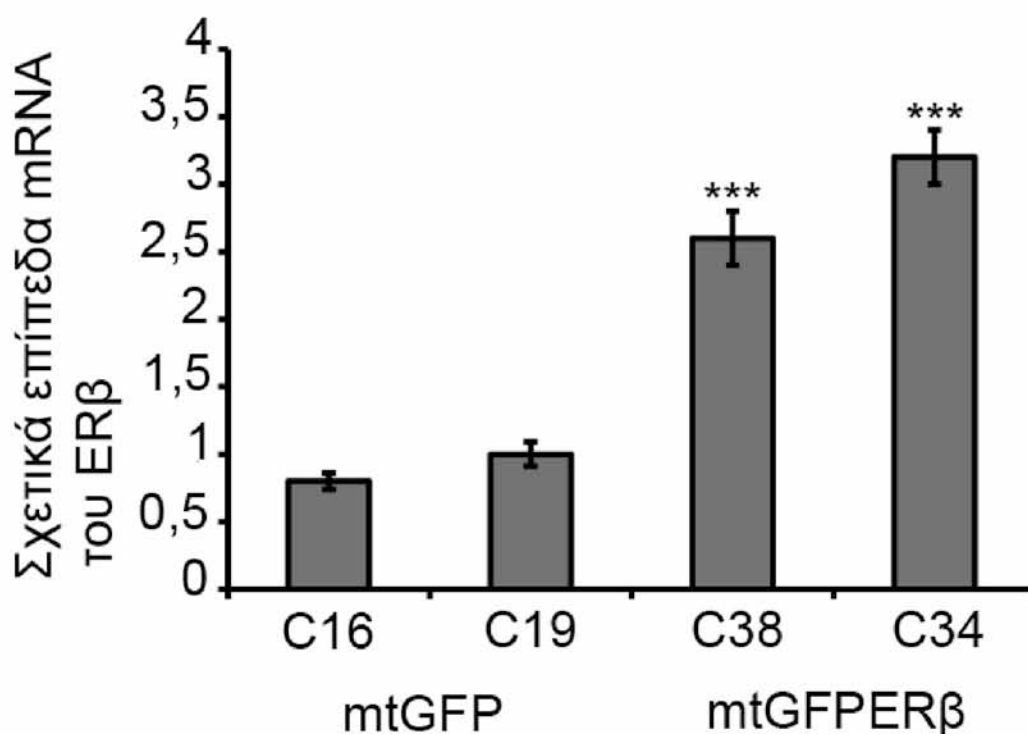
Αξίζει να αναφερθεί ότι, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, παρόμοια προσέγγιση, για τη δημιουργία κυττάρων τα οποία θα εξέφραζαν την πρωτεΐνη mtGFP-ERβ, είχε επιχειρηθεί και στο παρελθόν σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231. Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν, καθώς 1) δεν εκφράζουν ενδογενώς ERα, 2) εκφράζουν ενδογενώς μικρά επίπεδα του ERβ2 (πιθανών και του ERβ5) και 3) αποτελούν κύτταρα του μαστού (ο ιστός του μαστού υπόκειται σε οιστρογονική ρύθμιση). Τελικά, δεν έγινε δυνατή η απομόνωση κυττάρων MDA-MB-231, τα οποία θα εξέφραζαν την πρωτεΐνη mtGFP-ERβ.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**, οι αποικίες C16 και C19 των N2A mtGFP κυττάρων είναι θετικές ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης mtGFP και μάλιστα η αποικία C19 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης mtGFP σε σχέση με την αποικία C16. Όσον αφορά την κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ, οι αποικίες C38 και C34 έδειξαν να εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFP-ERβ και μάλιστα η αποικία C34 φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης mtGFP-ERβ σε σχέση με την αποικία C38, μετά την κανονικοποίηση και ως προς τα επίπεδα της έκφρασης της β-ακτίνης. Η πρωτεΐνη mtGFP ανιχνεύτηκε στην αποικία C34 των κυττάρων N2A mtGFPERβ, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται ή στην θραύση της υβριδικής πρωτεΐνης mtGFP-ERβ, με αποτέλεσμα την ανίχνευση της πρωτεΐνης mtGFP ή, σε γενωμικό επίπεδο, στην εξάλειψη σε κάποιο ποσοστό κυττάρων του γονιδίου του ERβ από τον αντίστοιχο φορέα έκφρασης.



**Εικόνα 15.** Επαγωγή των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης mtGFP και της υβριδικής πρωτεΐνης mtGFP-ERβ σε κύτταρα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ. Η αποτίμηση των επιπέδων της έκφρασης της πρωτεΐνης mtGFP ή/και της υβριδικής πρωτεΐνης mtGFP-ERβ επιτεύχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western της GFP πρωτεΐνης και της β-ακτίνης, σε ολικά εκχυλίσματα νευρικών κυττάρων N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων.

Στην **Εικόνα 16**, φαίνονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των επιπέδων mRNA του ERβ. Προηγήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο DMEM low glucose, η συλλογή και η λύση των κυττάρων, η απομόνωση του ολικού RNA και η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA του ERβ με τη μέθοδο Real Time PCR. Έτσι, όπως φαίνεται στο σχήμα, τα επίπεδα mRNA του ERβ στις αποικίες C38 και C34 των κυττάρων N2A mtGFPERβ, παρουσιάζουν 2-3 φορές αύξηση σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του ERβ στις αποικίες C16 και C19 των κυττάρων N2A mtGFP. Η αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της πρωτεΐνης του ERβ στις συγκεκριμένες αποικίες, υποδηλώνει την παραγωγή της υβριδικής πρωτεΐνης mtGFPERβ στα N2A mtGFPERβ κύτταρα, όπως και αναμενόταν.



**Εικόνα 16.** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου του ERβ σε κύτταρα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ : εφαρμόστηκε Real Time PCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA του ERβ και της β-ακτίνης σε απομονωμένο ολικό RNA από κύτταρα N2A mtGFPC2 και N2A mtGFPERβ. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Παρατηρούμε την αύξηση των επιπέδων mRNA του ERβ στις αποικίες C34 και C38 των κυττάρων N2A mtGFPERβ σε σχέση με τα επίπεδα mRNA του ERβ στις αποικίες C19 και C16 των κυττάρων N2A mtGFP. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ως μέση τιμή  $\pm$  S.D., \*\*\* P < 0,001, όταν συγκρίνονται με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου.







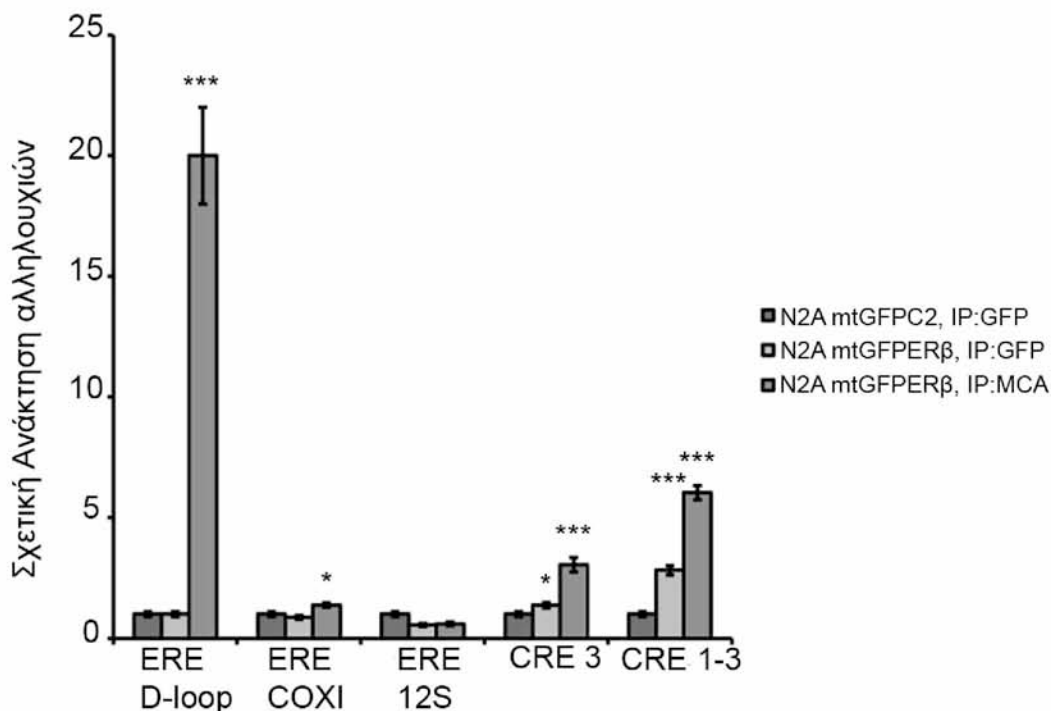
υβριδική πρωτεΐνη mtGFPERβ και από κύτταρα που την εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα ή ακόμα και από κύτταρα που δεν την εκφράζουν καθόλου). Έτσι, πρακτικά, απομονώθηκαν πληθυσμοί κυττάρων εμπλουτισμένοι ως προς την παρουσία κυττάρων που εκφράζουν σταθερά την υβριδική mtGFPERβ πρωτεΐνη. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι καρκινικές σειρές N2A mtGFPERβ, C38 και C34 είναι εμπλουτισμένες, με κύτταρα που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFPERβ, κατά 30%-40%, ενώ αντίστοιχα, η καρκινική σειρά N2A mtGFP, C19, είναι εμπλουτισμένη με κύτταρα τα οποία εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFP, κατά 50%-60%. Τα ποσοστά αυτά προέκυψαν από την επεξεργασία τουλάχιστον 30 εικόνων ανοσοφθορισμού για κάθε σταθερά διαμολυσμένη νευρική καρκινική σειρά.

### **3.3.2 Αλληλεπίδραση του μιτοχονδριακού ERβ με στοιχεία του μιτοχονδριακού DNA στα νευρικά κύτταρα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ**

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή (Ενότητα 1.2), στο μιτοχονδριακό DNA υπάρχουν μεταξύ άλλων, στοιχεία απόκρισης των οιστρογόνων (EREs), καθώς και στοιχεία απόκρισης στο cAMP (CRE), τόσο στην περιοχή D-loop όσο και διάσπαρτα στο υπόλοιπο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Chen et al., 2004; Chen et al., 2005). Συνυπολογίζοντας τον μιτοχονδριακό εντοπισμό των ERs (και κυρίως του ERβ), αλλά και το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει ο ERβ στη ρύθμιση της φυσιολογίας των νευρικών κυττάρων, μελετήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση του ERβ τόσο με τα στοιχεία EREs όσο και με τα στοιχεία CREs του μιτοχονδριακού γονιδιώματος νευρικών κυττάρων N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα της αποικίας C19 των N2A mtGFP και κύτταρα της αποικίας C38 και C34 των N2A mtGFPERβ καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 1g/L. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation – ChIP) τόσο με αντισώματα έναντι του GFP όσο και με αντισώματα έναντι του ERβ. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ύπαρξης στοιχείων EREs και CREs στο ανοσοκατακρημνισθέν σύμπλοκο, με εφαρμογή της μέθοδο Real Time PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 19**.

Όπως παρατηρούμαι στην **Εικόνα 19**, κατά την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης στα κύτταρα N2A mtGFPERβ με το αντίσωμα έναντι του ERβ, ανιχνεύθηκε η ύπαρξη στοιχείων EREs, τόσο στην D-loop περιοχή όσο και στην περιοχή COXI, αλλά και στοιχείων CREs, υποδηλώνοντας έτσι την αλληλεπίδραση της μιτοχονδριακής υβριδικής πρωτεΐνης mtGFPERβ με αυτά τα στοιχεία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η αλληλεπίδραση του GFPERβ με τα στοιχεία CREs επαληθεύτηκε και με τη χρήση αντισώματος έναντι της

πρωτεΐνης GFP. Ειδικότερα, παρατηρούμε ότι η σύνδεση της πρωτεΐνης GFP-ERβ με το στοιχείο ERE της D-loop ρυθμιστικής περιοχής είναι ισχυρότερη σε σχέση με τη σύνδεση στα στοιχεία CRE της D-loop. Επίσης, φαίνεται ότι το στοιχείο CRE 3 (AGACGCA), αποτελεί σημαντικό στοιχείο-στόχο της πρωτεΐνης mtGFP-ERβ. Το οποίο, με βάση δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας (Lee et al 2005), αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο απόκρισης για τον παράγοντα CREB. Επιπλέον ο μιτοχονδριακός υποδοχέας πιθανόν να αλληλεπιδρά και με τα στοιχεία CRE 1 (CATGCATT) και CRE 2 (AGCCGTCA), τα οποία μαζί και με την αλληλουχία CRE 3 εντοπίζονται στην αλληλουχία DNA CRE1-3, με την οποία αποκαλύπτεται ότι αλληλεπιδρά ο mtGFP-ERβ. Τέλος, παρατηρούμαι ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης mtGFP-ERβ με τα στοιχεία EREs, τα οποία εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή γενωμική περιοχή των γονιδίων COXI και 12S RNA είναι ασθενής έως και ανύπαρκτη, αντίστοιχα, σε σχέση με την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης GFP-ERβ με τα αντίστοιχα στοιχεία ERE και CRE της D-loop περιοχής, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα στοιχεία δεν αποτελούν αλληλουχίες αλληλεπίδρασης του ERβ με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα άρα και για τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τον ERβ.

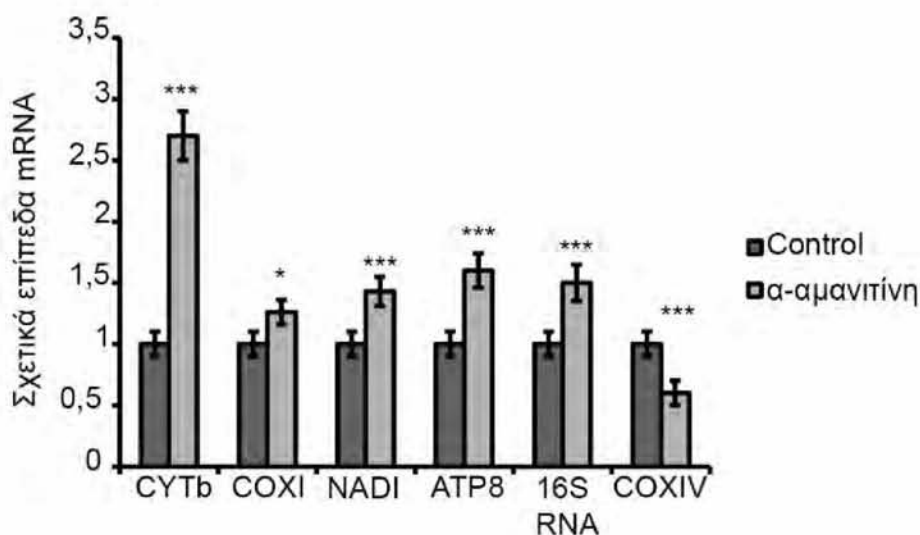


**Εικόνα 19.** Σύνδεση του μιτοχονδριακού ERβ στην περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA κυττάρων N2A mtGFPERβ: Σε κύτταρα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ (MCA) και του GFP. Τα επίπεδα του ανοσοκατακρημνισμένου DNA, στο οποίο συμπεριλαμβάνονται και τα εν δυνάμει στοιχεία απόκρισης EREs (οιστρογονοεξαρτώμενες αλληλουχίες) και CREs (αλληλουχίες ανταπόκρισης στον παράγοντα CREB) που βρίσκονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, αξιολογήθηκαν με τη εφαρμογή της μεθόδου της Real Time PCR και με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Αλληλουχίες DNA από το γονίδιο της β-ακτίνης αναλύθηκαν παράλληλα ως αλληλουχίες μη ειδικής ανοσοκατακρήμνισης. Υπολογίστηκε η σχετική ανάκτηση των υπό μελέτη αλληλουχιών σε σχέση με την ανάκτηση αλληλουχιών του γονιδίου της β-ακτίνης. Παρατηρούμαι τη σύνδεση του μιτοχονδριακού ERβ στις αλληλουχίες ERE και CREs της D-loop περιοχής. Οι αλληλουχίες CREs της D-loop περιοχής ανιχνεύονται κατά την ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης mtGFPERβ τόσο με το αντίσωμα έναντι του ERβ, όσο και με τη χρήση του αντισώματος έναντι GFP, παρότι σε μικρότερο ποσοστό. Αντίθετα, εντοπίστηκε μικρή και στατιστικά μη σημαντική σύνδεση του μιτοχονδριακού ERβ με τα πιθανά EREs των γονιδίων COXI και 12S RNA, αντίστοιχα. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ως μέση τιμή  $\pm$  S.D. \* P <0,05, \*\*\* P <0,001.

### 3.3.3 Έλεγχος της μεταγραφής μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων νευρικών κυττάρων από τον μιτοχονδριακό ERβ

Διερευνώντας την επίδραση του μιτοχονδριακού ERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφή στα νευρικά κύτταρα N2A-mtGFPERβ και έχοντας υπόψη τόσο τα ευρήματα των πειραμάτων της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης όσο και τις βιβλιογραφικές αναφορές (Εισαγωγή, Ενότητα 1.2), οι οποίες υποδεικνύουν ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τους υποδοχείς των οιστρογόνων, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων (OXPHOS) σε κύτταρα N2A-mtGFPERβ. Μάλιστα, με σκοπό τη διερεύνηση της άμεσης εμπλοκής του mtERβ στην ρύθμιση των γονιδίων OXPHOS, καλλιεργήθηκαν κύτταρα των αποικιών C38-C34 (N2A mtGFPERβ) σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, στα οποία χορηγήθηκε α-αμανιτίνη (σε τελική συγκέντρωση 10  $\mu$ g/ml). Η α-αμανιτίνη αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της RNA-πολυμεράσης II και της RNA-πολυμεράσης III όχι όμως της μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης. Έτσι παρουσία της α-αμανιτίνης αναστέλλεται η πυρηνική μεταγραφή γονιδίων, όχι όμως και η μιτοχονδριακή (Seifart & Sekeris, 1969; Lindell et al., 1970). Ακολούθησε η συλλογή και η λύση των κυττάρων, η απομόνωση του ολικού RNA και η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων με τη μέθοδο της Real Time PCR. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 20**.

Στην **Εικόνα 20** απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της διερεύνησης των επιπέδων έκφρασης των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων *COXI*, *NADI*, *ATP8*, *CYTB* και *16SRNA*, αλλά και του πυρηνικά κωδικοποιούμενου γονιδίου *COXIV* (το οποίο αποτελεί και τον αρνητικό μάρτυρά μας, δεδομένου ότι η έκφρασή του ρυθμίζεται από την πυρηνική δράση των ERs (Klinge et al., 2008). Παρατηρούμε ότι παρουσία της  $\alpha$ -αμανιτίνης, (**Εικόνα 20**), τα επίπεδα mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων που μελετήθηκαν, παρουσιάζονται αυξημένα στα κύτταρα που υπερκφράζουν τον μιτοχονδριακό ERβ, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *COXIV* μειώνονται, όπως ήταν αναμενόμενο, υποδηλώνοντας έτσι την τη σίγηση της πυρηνικής μεταγραφικής ενεργότητας αλλά και την άμεση εμπλοκή του μιτοχονδριακού ERβ στην ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής.



**Εικόνα 20.** Επίδραση του μιτοχονδριακού ERβ στη μεταγραφή μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων: εφαρμόστηκε Real Time PCR, με χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών, για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των γονιδίων *COXI*, *NADI*, *ATP8*, *16S RNA*, *CYTB*, *COXIV* και της  $\beta$ -ακτίνης σε απομονωμένο ολικό RNA από νευρικά κύτταρα N2A-miGFPERβ, τα οποία είχαν επωαστεί για 5 ώρες παρουσία ή απουσία 10  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -αμανιτίνης σε θρεπτικό μέσω απουσία ορμονών. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων των N2A-miGFPERβ κυττάρων, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την  $\beta$ -ακτίνη. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ως μέση τιμή  $\pm$  S.D. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , ως προς τα κύτταρα αναφοράς απουσία  $\alpha$ -αμανιτίνης.

### 3.3.4 Χαρακτηρισμός μορίων που αλληλεπιδρούν με τον μιτοχονδριακό ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον

Δεδομένου ότι ο ERβ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια πολλών τύπων κυττάρων, μεταξύ αυτών και νευρικών κυττάρων και έχοντας ενδείξεις για τη συμβολή του στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, επιχειρήθηκε ο χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Ο χαρακτηρισμός των μορίων αυτών θα συντελέσει στο χαρακτηρισμό των μιτοχονδριακών βιοχημικών διεργασιών, η ρύθμιση των οποίων υπόκειται, άμεσα ή έμμεσα, υπό τον έλεγχο του μιτοχονδριακού ERβ. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του μιτοχονδριακού ERβ, σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από κύτταρα N2A-mtGFPERβ και στην συνέχεια χαρακτηρισμός της πρωτεϊνικής σύστασης των ανοσοκαταμνησθέντων συμπλόκων με εφαρμογή μεθόδων πρωτεομικής ανάλυσης. Τα κύτταρα N2A-mtGFP χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα αναφοράς, για τον αποκλεισμό ψευδώς θετικών αλληλεπιδράσεων. Συγκεκριμένα, κύτταρα της αποικίας C11 των N2A mtGFP και κύτταρα της αποικίας C38 και C34 των N2A mtGFPERβ αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό DMEM low glucose. Ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων, η απομόνωση του μιτοχονδριακού κλάσματος με τη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρωσης, η ανοσοκατακρήμνιση του mtGFP ή του mtGFPERβ τόσο με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP όσο και με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ERβ και τέλος η πρωτεομική ανάλυση των ανοσοκατακρημνισθέντων συμπλόκων, με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry). Η διαδικασία της φασματομετρίας μάζας, αλλά και η ανάλυση του κύριου όγκου των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ", σε συνεργασία με την Δρ. Μ. Σαμιωτάκη και τον Δρ. Γ. Παναγιώτου. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στις **Εικόνες 21** και **22**. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 5 βιολογικές επαναλήψεις, τρεις με χρήση του αντισώματος έναντι του ERβ και δύο με αντισώματα έναντι της GFP πρωτεΐνης. Ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα N2A mtGFP, στα οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με αντισώματα έναντι της GFP πρωτεΐνης.

Στην **Εικόνα 21**, αναφέρονται οι κοινές μεταξύ και των 5 επαναλήψεων πρωτεΐνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αλληλοπιδρώντα με τον ERβ μόρια μετά και την αφαίρεση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στα δείγματα αναφοράς. Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 11 πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τον mtERβ μέσα στα μιτοχόνδρια. Παρακάτω περιγράφεται ο βιολογικός ρόλος των μορίων:

- 1) Συνθάση του ATP: Η συνθάση του ATP είναι ένζυμο που συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, για τη δημιουργία της τριφωσφορικής αδενοσίνης

(ATP), που αποτελεί το "ενεργειακό νόμισμα" των κυττάρων για τους περισσότερους οργανισμούς. Η συνθάση του ATP, η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αποτελείται από δύο κύριες υπομονάδες, την  $F_0$  και την  $F_1$ , οι οποίες μοιάζουν με έναν περιστροφικό μηχανισμό-κινητήρα που επιτρέπει την παραγωγή ATP. Η  $F_0$  προκαλεί την περιστροφή της  $F_1$  και αποτελείται από τις υπομονάδες a, b, d, και F6. Η  $F_1$  αποτελείται από τις υπομονάδες  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  και  $\delta$  (Velours et al., 2000).

- 2) Ras-related protein Rab: Η οικογένεια πρωτεϊνών Rab αποτελεί ένα μέλος της υπεροικογένειας μονομερών πρωτεϊνών G, των Ras. Περίπου 70 τύποι πρωτεϊνών Rab έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Οι πρωτεΐνες Rab έχουν μια ενεργότητα GTPάσης, η οποία ρυθμίζει μεταξύ άλλων διάφορα στάδια σχηματισμού και μετακίνησης κυστιδίων κατά μήκος των δικτύων ακτίνης και τουμπουλίνης και τέλος της σύντηξης τους με τις μεμβράνες. Όπως συμβαίνει και με άλλες GTPάσες, οι Rabs ισορροπούν μεταξύ δύο διαμορφώσεων, μιας αδρανούς μορφής συνδεδεμένης με το GDP (διφωσφορική γουανωσίνη) και μιας δραστηκής μορφής συνδεδεμένης με GTP (τριφωσφορική γουανωσίνη). Γενικά οι Rabs είναι υπεύθυνες κυρίως για: την επιλογή, τη συγκρότηση, τη μεταφορά και την σύνδεση κυστιδίων (Hutagalung & Novik, 2009).
- 3) Heat Shock Proteins (Μιτοχονδριακές): Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι γενικά υπεύθυνες για την πρόληψη βλαβών σε πρωτεΐνες κατά την απόκριση σε υψηλά επίπεδα θερμότητας. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ταξινομούνται σε έξι κύριες οικογένειες με βάση τη μοριακή τους μάζα: τα μικρά HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 και HSP110. Εμπλέκονται στην εισαγωγή πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα προς τα μιτοχόνδρια και στη μακρομοριακή συναρμολόγηση. Διευκολύνουν, επίσης, τη σωστή αναδίπλωση των εισαγόμενων πρωτεϊνών, εμποδίζοντας την εσφαλμένη αναδίπλωσή τους (De Maio, 1999; Wu, 1995).
- 4) Αντιγόνο CD63: Το αντιγόνο CD63 είναι μια πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών και συνδέεται κυρίως με τις μεμβράνες των ενδοκυτταρικών κυστιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές μεσολαβούν σε γεγονότα μεταγωγής σήματος που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, στην ενεργοποίηση και στην κινητικότητα διαφόρων μορίων. Η έρευνα στον τομέα των τετρασπανινών είναι σχετικά πρόσφατη (λιγότερο από 20 χρόνια) και επομένως δεν γνωρίζουμε πολλές πτυχές για τη λειτουργία των συγκεκριμένων τετρασπανινών. Γενικά, οι τετρασπανίνες θεωρείται ότι δρουν ως πρωτεΐνες-σκαλωσιές, αγκυροβολώντας πολλαπλές πρωτεΐνες σε μία περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης (Hemler, 2005).



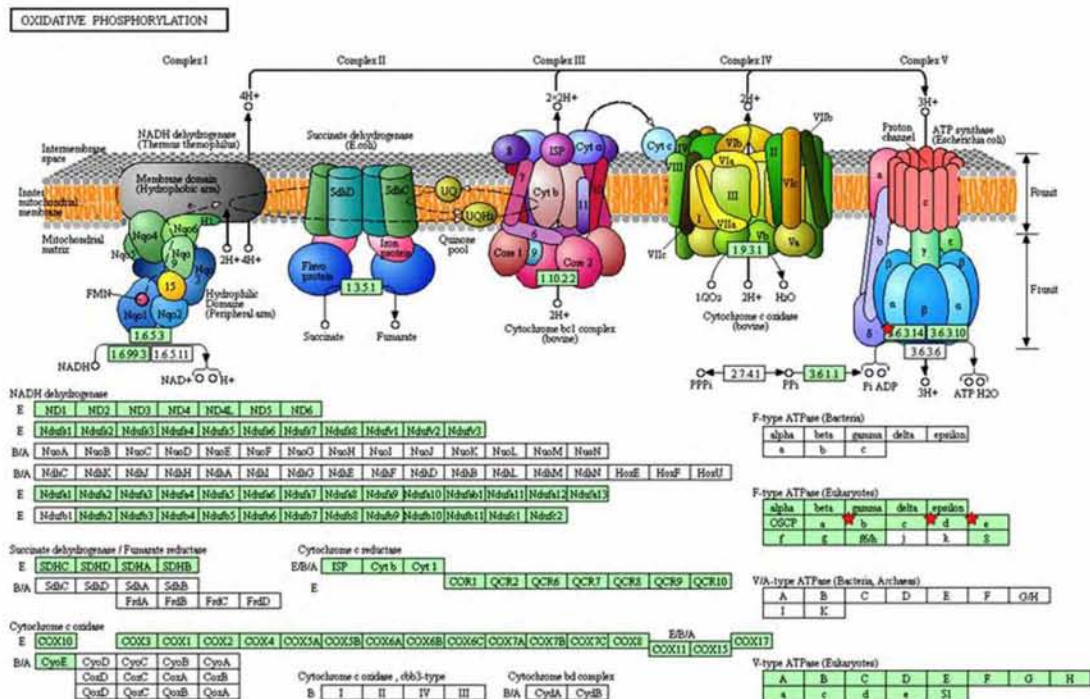
- 5) Μεταφορέας γλυκόζης: Ο μεταφορέας γλυκόζης 3 (ή GLUT3), επίσης γνωστός ως solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 (SLC2A3), είναι μια πρωτεΐνη που διευκολύνει τη μεταφορά γλυκόζης διαμέσου των μεμβρανών στα κύτταρα των θηλαστικών. Ο GLUT3 είναι περισσότερο γνωστός για την ειδική έκφραση του σε νευρώνες και έχει αρχικά οριστεί ως ο νευρωνικός GLUT. Αν και βρέθηκε ότι ο GLUT3 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, εκφράζεται κυρίως σε νευρώνες, που εντοπίζονται στους νευροάξονες και στους δενδρίτες. Ο GLUT3 έχει πολύ υψηλότερη συγγένεια για τη γλυκόζη (τουλάχιστον πενταπλάσια μεταφορική ικανότητα σε σχέση με τους GLUT1, GLUT2 και GLUT4) (Simpson et al., 2008).
- 6) Sodium/potassium-transporting ATPase: Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια μεμβρανική αντλία νατρίου/καλίου, η οποία χρησιμοποιεί ATP για αυτή τη λειτουργία. Η λειτουργία της είναι να "μεταφέρει" 3 ιόντα νατρίου έξω από τη μεμβράνη για κάθε 2 ιόντα καλίου που λαμβάνονται. Η πρωτεΐνη μπορεί επίσης να αφήσει και την αντίστροφη λειτουργία να συμβεί, αξιοποιώντας έτσι την ενέργεια που έχει αποθηκεύσει με τη μορφή δυναμικού ηλεκτρικού πεδίου. Η αντίστροφη διαδικασία είναι αυθόρμητη. Αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο για τη φυσιολογία των κυττάρων, όπως για παράδειγμα συμμετέχει στην αγωγιμότητα των νευρών (Clausen et al., 2017).
- 7) Κατιόν-εξαρτώμενος υποδοχέας της 6-φωσφορικής μαννόζης: Γνωστή επίσης και ως υποδοχέας της 6-φωσφορικής μαννόζης, αποτελεί μια πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφορυλιωμένων λυσοσωμικών ενζύμων από το σύμπλεγμα Golgi και την κυτταρική μεμβράνη προς στα λυσοσώματα. Τα λυσοσωμικά ένζυμα που φέρουν φωσφο-μαννοζυλικά κατάλοιπα δεσμεύονται ειδικά στους υποδοχείς της 6-φωσφορικής μαννόζης στο σύμπλεγμα Golgi και το προκύπτον σύμπλοκο (υποδοχέα-προσδέματος) μεταφέρεται σε ένα όξινο προ-λύσωμα, όπου το χαμηλό pH αναδιατάσσει το σύμπλοκο (Ghosh et al., 2003; Ghosh & Kornfeld, 2004).

Protein name	UniProt gene number
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	Q9CQQ7
CD63 antigen	P41731
Ras-related protein Rab-5C	P35278
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	P32037
ATP synthase subunit e, mitochondrial	Q06185
Ras-related protein Rab-8A	P55258

Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	P24668
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	P97370
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809
ATP synthase subunit d, mitochondrial	Q9DCX2
Stress-70 protein, mitochondrial	P38647



**Εικόνα 21.** Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον μιτοχονδριακό υποδοχέα οιστρογόνων: Α) Πρωτεΐνες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ως αλληλεπιδρώντα μόρια με τον mtERβ στα κύτταρα N2A mtGFPERβ με εφαρμογή μεθόδων ανοσοκατακρήμνισης και φασματομετρίας μάζας. Στον πίνακα απεικονίζεται το όνομα της πρωτεΐνης αλλά και ο αντίστοιχος αριθμός του γονιδίου στη βάση δεδομένων της UniProt. Β) Κατανομή των αλληλεπιδρώντων με τον mtERβ μορίων με βάση τη βιολογική τους δράση.



**Εικόνα 22.** Απεικόνιση των υπομονάδων της συνθήσεως του ATP, με τις οποίες αλληλεπιδρά ο mtERβ. Με κόκκινο αστερίσκο είναι σημεισμένες οι υπομονάδες b,d και e της υπομονάδας F<sub>1</sub> της συνθήσεως του ATP και η υπομονάδα B1 της υπομονάδας F<sub>0</sub> (η Εικόνα 21 προέκυψε από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα **DAVID: Functional Annotation Tools**).

## 4. Συζήτηση

Τα οιστρογόνα ανήκουν στις στεροειδείς ορμόνες και όπως έχει ήδη αναφερθεί μπορούν να ρυθμίσουν διάφορες διεργασίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ομοιοστάση του οργανισμού και τον μεταβολισμό των κυττάρων, σε ιστούς-στόχους, δηλαδή σε ιστούς που υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση. Τα οιστρογόνα ασκούν τη βιολογική τους δράση κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής τους με του αντίστοιχους υποδοχείς των οιστρογόνων, οι οποίοι ανήκουν στην ευρύτερη υπερικογενεία των πυρηνικών υποδοχέων (Bjornstrom & Sjoberg, 2005). Έχουν ταυτοποιηθεί δυο κύριες ισομορφές του υποδοχέα των οιστρογόνων: η ισομορφή α (ERα) και η ισομορφή β (ERβ) και η κατανομή τους στους διάφορους ιστούς ποικίλει (Gustafsson, 1999). Οι υποδοχείς των οιστρογόνων ασκούν τη δράση τους μέσω γενωμικών και μη γενωμικών οδών. Στις γενωμικές δράσεις περιλαμβάνονται 1) οι άμεσες γενωμικές δράσεις, δηλαδή η απευθείας πρόσδεση του ενεργοποιημένου, υπό μορφή διμερούς, υποδοχέα στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, οι οποίοι φέρουν τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες πρόσδεσης των ERs, τα EREs και 2) οι έμμεσες γενωμικές δράσεις, δηλαδή η αλληλεπίδραση των ERs με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, ελέγχοντας έτσι τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων αυτών. Όσο αφορά τις μη γενωμικές γρήγορες δράσεις, αυτές επιτελούνται είτε μέσω ενεργοποίησης των μεμβρανικών υποδοχέων ER είτε μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης των ERs απουσία οιστρογόνων, ενεργοποιώντας έτσι διάφορους διακυτταρικούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος (Bjornstrom & Sjoberg, 2005).

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, μεταξύ αυτών στον καρκίνο του μαστού. Έχει αποδειχθεί η συμμετοχή του ERα στην προαγωγή της ογκογένεσης αλλά και στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, όπως αντίστοιχα, έχουν αποδειχθεί οι αντικαρκινικές ιδιότητες του ERβ, οι οποίες έγκειται στην αναστολή της δράσης του ERα αλλά και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (Hayashi et al., 2003). Επίσης, έχει προταθεί η νευροπροστατευτική δράση των ERs στα νευρικά κύτταρα, καθώς πιθανές δυσλειτουργίες της οιστρογονικής σηματοδότησης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων και έλεγχο αποπτωτικών μηχανισμών (Simpkins et al., 2012; Fiocchetti et al., 2012).

Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, φυσικοί ή τεχνητοί, γνωστοί και ως ξενοοιστρογόνα, μπορούν να ασκούν επίδραση στις κυτταρικές λειτουργίες μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς των οιστρογόνων δρώντας ως ενδοκρινείς διαταράκτες. Τα μόρια αυτά

παρεμβαίνουν στην παραγωγή, τη μεταφορά, την αποδόμηση αλλά και την ενεργότητα των υποδοχέων των οιστρογόνων (Darbre, 2005). Παρόλο που η σταθερά συγγένειας των ξενοοιστρογόνων με τους ERs είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τη συγγένεια των ERs με τα οιστρογόνα, εκτιμάται ότι η συγγένεια των ξενοοιστρογόνων μπορεί να είναι ακόμα και 10.000 φορές πιο ασθενής σε σχέση με την αντίστοιχη της οιστραδιόλης, η συσσώρευση τέτοιων μορίων στον οργανισμό μπορεί να διαταράξει πολλές μεταβολικές διεργασίες (Albini et al., 2014; Darbre 2005).

Μια ιδιαίτερη κατηγορία των ξενοοιστρογόνων αποτελούν τα μεταλλοοιστρογόνα, δηλαδή ανιόντα ή κατιόντα μετάλλων, όπως καδμίου και νικελίου, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδρούν με τους ERs, ασκώντας έτσι επίδραση σε διάφορες ορμονοεξαρτώμενες βιοχημικές διεργασίες (Darbre, 2006b; Darbre, 2006a). Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των μεταλλοοιστρογόνων όπως του καδμίου και του νικελίου, ως προς την επίδρασή τους στην οιστρογονική σηματοδότηση, αποκαλύπτει ότι: Α) ενώσεις καδμίου μπορεί να προσδένονται στην LBD των ERs μιμούμενα τη δράση των οιστρογόνων, ενώ Β) ενώσεις νικελίου μπορούν να αντικαθιστούν τα μόρια Zn στην DBD των ERs, μεταβάλλοντας έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα των υποδοχέων (Aquino et al., 2012). Εν δυνάμει μεταλλοοιστρογόνα αναδεικνύονται και ενώσεις αργιλίου, οι οποίες βρίσκονται σε αυξημένες ποσότητες τόσο στο νερό και τη τροφή όσο και σε προϊόντα κοσμετολογίας. Αυξημένες συγκεντρώσεις αργιλίου έχουν εντοπισθεί 1) στο μαστό, στο μητρικό γάλα και στους ιστούς περιφερειακά των μαστών, καθώς και 2) στον εγκέφαλο και γενικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα ανθρώπων που πάσχουν από τη νόσο του Parkinson και τη νόσο του Alzheimer (Becaria et al., 2002; Maya et al., 2016). Αξίζει να αναφερθεί ότι το ACH χρησιμοποιείται ευρέως σε προϊόντα κοσμετολογίας όπως τα αντιδρωτικά. Η παρουσία των ιόντων αργιλίου σε αυτά τα βιολογικά δείγματα έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία και την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, και με την εμπλοκή τους σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα, αντίστοιχα.

Με σκοπό να διερευνήσουμε την πιθανή οιστρογονική δράση των ενώσεων του αργιλίου, μελετήθηκε η επίδραση του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου (aluminum chlorohydrate - ACH), σε ορμονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 καθώς και σε νευρικά κύτταρα N2A και SH-SY5Y. Η επιλογή των συγκεκριμένων τύπων κυττάρων βασίζεται στο ότι στους ιστούς προέλευσής τους, όπως προαναφέρθηκε, έχουν ανιχνευθεί αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων αργιλίου, αφενός λόγω της γειννίας του μαστού με περιοχές συχνής έκθεσης σε αντιδρωτικά και αφετέρου λόγω δυνατότητας των ιόντων αργιλίου να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επιπλέον, τόσο ο μαστός όσο και το νευρικό σύστημα αποτελούν ιστούς-στόχους της οιστρογονικής σηματοδότησης (Gustafsson, 1999).

Για τη μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης του αργιλίου και της επίδρασής του στη φυσιολογία των κυττάρων του μαστού και των νευρικών κυττάρων, ελέγχθησαν συγκεντρώσεις αλάτων αργιλίου σε εύρος τιμών από  $10^{-6}\text{M}$ - $10^{-4}\text{M}$ . Βάση δεδομένων από προηγούμενες μελέτες α) της Darbre και των συνεργατών της, όπου άλατα αργιλίου συγκέντρωσης  $10^{-4}\text{M}$  ACH ( $100\text{ }\mu\text{M}$  ή περίπου  $17\text{ mg/L}$ ), υποδεικνύεται ότι αυξάνουν κατά περίπου δύο φορές την ERE επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων αναφοράς (Darbre et al., 2005; Darbre et al., 2006), αλλά και με βάση β) άλλες βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι ενώσεις άλλων μετάλλων, όπως ενώσεις υδραργύρου μπορεί να δράσουν ως ενδοκρινείς διαταράκτες και εν δυνάμει μεταλλοοιστρογόνα σε συγκεντρώσεις  $100\text{ }\mu\text{M}$  (Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice, 2007).

Επίσης, πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι η απορρόφηση ιόντων αργιλίου από τον οργανισμό κυμαίνεται από  $<0,1\%$  έως  $3\%$  (Scientific Committee on Consumer Safety, 2014) και εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως: α) τη φυσιολογία του κάθε ιστού, συμπεριλαμβανομένης της διαφορετικής προέλευσης και ακεραιότητας των ιστών β) το είδος των βιο-ενώσεων που σχετίζονται με τη συσσώρευση αργιλίου στον οργανισμό, (π.χ. μεγαλύτερη ικανότητα απορρόφησης παρατηρείται υπό τη μορφή του κυτταρικού αργιλίου σε σχέση με το φωσφορικό ή το γαλακτικό αργίλιο, γ) το pH του διαλύματος ή γενικά του περιβάλλοντος, στο οποίο βρίσκονται τα ιόντα του αργιλίου (μεγάλη διαλυτότητα σε χαμηλές τιμές pH) και δ) καθώς και οι γενετικές διαφοροποιήσεις των πληθυσμών (Scientific Committee on Consumer Safety, 2014). Όπως αναφέρεται και στη σχετική μελέτη για την ασφάλεια της χρήσης προϊόντων αργιλίου της Επιστημονικής επιτροπής για την ασφάλεια των καταναλωτών (Scientific Committee on Consumer Safety): 1) η μέση έκθεση των ενηλίκων στο αργίλιο κυμαίνεται μεταξύ  $5\text{--}10\text{ mg}$  ημερησίως και 2) το χαμηλότερο επίπεδο ανεπιθύμητων ενεργειών του αργιλίου είναι τα  $100\text{ mg}$  ημερησίως, ενώ τα επίπεδα αργιλίου στα οποία δεν εντοπίζονται παρενέργειες είναι τα  $30\text{ mg}$  ημερησίως (Scientific Committee on Consumer Safety, 2014). Λαμβάνοντας υπ όψιν όλα τα παραπάνω και δεδομένου ότι η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε κυτταρικές σειρές, στις οποίες η έκθεση των κυττάρων στις ενώσεις αργιλίου ελάμβανε χώρα σε περιορισμένο χρονικό διάστημα με σκοπό να προσομοιαστεί η επίδραση του αργιλίου στον μεταβολισμό των κυττάρων κατά τη μακρόχρονη έκθεσή τους στο αργίλιο επιλέχθηκε η συγκέντρωση  $10^{-4}\text{ M}$  του ACH, για τις μελέτες, τα αποτελέσματα των οποίων αναλύονται στην συνέχεια.

Κατά την επώαση των κυττάρων MCF-7 (για 3 και 5 μέρες) σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (από  $10^{-9}\text{M}$  έως  $10^{-4}\text{M}$ ) του ACH, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ αντίθετα παρουσία της E2 επάγεται κυτταρικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων MCF-7. Παρόμοια δράση, δηλαδή μη-

επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από μεταλλοιστρογόνα, παρατηρείται και σε περιπτώσεις άλλων μεταλλοιστρογόνων (Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice, 2007).

Όσο αφορά την επίδραση του ACH στη μεταγραφική ενεργότητα των ERs, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση (10-20%) της ERE-εξαρτώμενης έκφρασης γονιδίου αναφοράς, σε ERα-θετικά κύτταρα MCF-7, κατά την επώασή τους (4 μέρες) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ACH (από  $10^{-6}$ M έως  $10^{-4}$ M). Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων μας και των αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών, που δείχνουν περίπου διπλάσια μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα οιστρογόνων, μετά από 8 ημέρες έκθεσης των κυττάρων MCF-7 σε άλατα αργιλίου (Darbre et al., 2006, Saceda et al., 1988), αποδίδεται στη διαφορετική διάρκεια επώασης των κυττάρων με ACH. Η περιορισμένη, έως μηδενική επίδραση των αλάτων αργιλίου (ACH) στην μεταγραφή γονιδίων που υπόκεινται υπό τον έλεγχο ERE οιστογονο-εξαρτώμενων αλληλουχιών επιβεβαιώθηκε και σε κύτταρα HEK293 και N2A, τα οποία εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης ERs κυττάρων, υπό συνθήκες έκφρασης είτε ενδογενών επιπέδων ERs είτε υπερεκφρασμένων μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς που υπαγορεύουν την έκφραση των ERα και ERβ. Η μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων στα MCF-7 κύτταρα και αυτών στα HEK293 και N2A κύτταρα πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία ή απουσία, αντίστοιχα, κατάλληλων συμπαραγόντων, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την επαγωγή των άμεσων γενωμικών δράσεων των ERs.

Δεδομένου ότι η επίδραση ACH στις άμεσες γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων, ήταν σχετικά περιορισμένη, εστίασαμε στην πιθανή εμπλοκή του ACH στις έμμεσες γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων και στη ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, επώαση των MCF-7 κυττάρων με  $10^{-4}$ M ACH, για 4 ημέρες, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης ERα κατά 50% σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Ο μοριακός μηχανισμός της ACH-επαγόμενης αύξησης των επιπέδων της πρωτεΐνης ERα μπορεί να αποδοθεί, εν μέρει, σε οιστρογονική δραστικότητα του αργιλίου, καθώς η δράση αυτή αναιρείται παρουσία του ανταγωνιστή του ERα, ICI 182,780, ο οποίος είναι γνωστό επίσης ότι προκαλεί αποικοδόμηση και κατά συνέπεια μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα (Osborne, 2004; Jaber, 2006, Johnston & Cheung 2010). Όσο αφορά την επίδραση της E2 στα πρωτεϊνικά επίπεδα ERα των MCF-7 κυττάρων, παρατηρήθηκε περίπου 20 % επαγόμενη μείωση. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα (Saceda et al., 1988; Pinzone et al., 2004) και αποδίδεται είτε στην άμεση δέσμευση του συμπλόκου ERα-E2 στα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (ERE) της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου του ERα (Pinzone et al., 2004), είτε στην επαγωγή της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης ERα παρουσία E2 (Nawaz et al., 1999). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι παρουσία του ACH, η επίδραση της E2 στα επίπεδα της πρωτεΐνης του ERα εξασθενεί,

υποδεικνύοντας πιθανή παρεμβολή του αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση μέσω ενός ανταγωνιστικού μηχανισμού του ACH στους μηχανισμούς αρνητικής ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης ERα από την E2.

Προκειμένου να εξεταστεί εάν η επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα βασίζεται στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του ERα μελετήθηκε και αξιολογήθηκε η επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA του ERα, σε κύτταρα MCF-7. Σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα (που περιγράφονται στο Pinzone et al., 2004), η έκθεση των κυττάρων MCF-7 σε  $10^{-9}$  M E2 για 6 ώρες, προκάλεσε 200% αύξηση των επιπέδων mRNA του ERα. Όσον αφορά την επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA του ERα, παρατηρήθηκε μια μικρή επαγωγή της τάξης του 10%-20%, η οποία είναι σύμφωνη και με την αντίστοιχη επαγωγή της ACH-εξαρτώμενης μεταγραφικής ενεργότητας του ERα. Αξίζει να αναφερθεί ότι παρόμοια διαφορική επίδραση στα πρωτεϊνικά επίπεδα και στα επίπεδα mRNA του ERα έχει επίσης παρατηρηθεί στην περίπτωση του ξενοοιστρογόνου Nar (La Rosa et al., 2014). Η υπόθεση της εργασίας μας είναι ότι το ACH, μέσω της εμπλοκής του σε μηχανισμούς μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίοι σηματοδοτούν την πρωτεόλυση του ERα (Kawahara & Kato-Negishi, 2010; Tecalco-Cruz & Ramírez-Jarquín, 2016), πιθανόν να ελέγχει και την σταθερότητά του.

Διερευνώντας τον πιθανό μηχανισμό με τον οποίο το ACH επηρεάζει τα επίπεδα του ERα, εξετάσαμε κατά πόσο το ACH ελέγχει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ERα, στην θέση S118. Η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser118 του ERα σχετίζεται άμεσα με την σταθερότητα της πρωτεΐνης, καθώς η φωσφορυλίωση σε αυτή τη θέση επάγει την ουβικουιτινίωση, άρα και την αποικοδόμηση του ERα (Lipfert et al., 2006; Valley et al., 2005; Grisouard et al., 2007). Τόσο η Ngb όσο και η E2 επάγουν τη φωσφορυλίωση του ERα στο κατάλοιπο της Ser118, μέσω του μη προσδετο-εξαρτώμενου και του προσδετο-εξαρτώμενου μηχανισμού, αντίστοιχα (Lipfert et al., 2006). Τα δεδομένα της μελέτης μας δείχνουν ότι παρουσία του ACH μειώνεται η από E2- και η από Ngb-επαγόμενη φωσφορυλίωση του ERα.

Έτσι, η δράση αυτή του ACH αναιρεί μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης, όπου αυξημένα επίπεδα E2 ενεργοποιούν μηχανισμούς μείωσης των επιπέδων ERα και ελέγχου της παρατεταμένης οιστρογονικής σηματοδότησης. Γνωρίζοντας ότι πολλά μεταλλοοιστρογόνα (όπως οι ενώσεις του καδμίου και του νικελίου) αλληλεπιδρούν με αμινοξέα των υποδοχέων των οιστρογόνων (Byrne et al., 2009) και υποθέτοντας αντίστοιχα ότι τα ιόντα αργιλίου λόγω φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους μπορούν να αλληλεπιδράσουν με φωσφορικές ομάδες, άρα και με την Ser118 (Maya et al., 2016), συμπεραίνουμε ότι η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να



αναστείλει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από τις πρωτεάσες (Kawahara & Kato-Negishi, 2011), σταθεροποιώντας έτσι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα στο κύτταρο.

Επίσης, κατά τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που αποτελούν στόχο της οιστρογονικής σηματοδότησης αλλά και κομβικών μορίων-ελέγχου καρκινογένεσης, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του p53, κατά την επώαση κυττάρων MCF-7 τόσο με  $10^{-4}$ M ACH, όσο και με  $10^{-9}$ M E2 ή και συνδυασμό αυτών, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Η δράση αυτή αναιρέθηκε παρουσία του αναστολέα του ERα, ICI, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 δεν μεταβλήθηκαν στα ERα-αρνητικά κύτταρα MDA-MB-231, κατά την επώασή τους είτε με ACH είτε με E2, υποδηλώνοντας έτσι την ERα-διαμεσολαβούμενη επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων του p53.

Όπως αναφέρθηκε, η ACH-επαγόμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα ενισχύει σε μικρό ποσοστό την ERE-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργότητα του ERα στα κύτταρα MCF-7. Πολλά γονίδια-στόχοι όμως της ERα διαμεσολαβούμενης οιστρογονικής σηματοδότησης υπόκεινται σε από ERE-ανεξάρτητο έλεγχο της μεταγραφής τους. Έτσι τόσο στον υποκινητή του γονιδίου του p53, όσο και στους υποκινητές των γονιδίων c-fos και κυκλίνης D1, υπάρχουν περιοχές πλούσιες σε GC (αλληλουχίες Sp1) (Marino et al., 2006, Gu et al., 2012), οι οποίες όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή εμπλέκονται στην έμμεση γενωμική οδό σηματοδότησης των ERs. Επίσης στον υποκινητή του γονιδίου του c-fos υπάρχουν αλληλουχίες AP-1, ενώ στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης D1, ενός γνωστού μορίου-στόχου της οιστρογονικής σηματοδότησης, υπάρχουν και στοιχεία CRE και αλληλουχίες AP-1 (Marino et al., 2006).

Στην παρούσα διατριβή, μελέτες ελέγχου έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων, τα οποία επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (Sutherland et al., 1995), έδειξαν ότι το ACH επηρεάζει της έκφρασή τους. Συγκεκριμένα, η έκφραση των επιπέδων mRNA του p53, το οποίο αποτελεί γονίδιο-στόχο του ERα αυξήθηκε στα κύτταρα MCF-7, τα οποία επώαστηκαν για 2 ή 6 ώρες με ACH ή/και E2, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Η αθροιστική δράση του ACH και της E2 στη σύνθεση mRNA του p53 υποδηλώνει πιθανή οιστρογονική δράση του ACH, η οποία θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα είτε α) μιας άμεσης επίδρασης του ACH στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα είτε β) θα μπορούσε να σχετίζεται με την επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των οιστρογόνων (ERα) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του p53, αλλά και στην καταστολή της αντικαρκινικής δράσης του. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε παρατηρήσεις που δείχνουν την άμεση αλληλεπίδραση του ERα με τον p53 (Liu et al., 2006, 2009; Sayeed et al., 2007), η οποία οδηγεί σε ERα-εξαρτώμενη αναστολή της μεταγραφικής

δραστικότητας του p53, και έτσι στην καταστολή της έκφρασης των αντι-πολλαπλασιαστικών και αποπτωτικών γονιδίων που υπόκεινται σε ρύθμιση από τον p53 (Liu et al 2006, 2009; Sayeed et al., 2007; Berger et al., 2012). Η συμμετοχή ERα στην ACH-επαγόμενη αύξηση των επιπέδων του mRNA αλλά και πρωτεϊνικών επιπέδων του p53 υποστηρίζεται και από την αδυναμία του ACH να επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου p53 στα ERα-αρνητικά κύτταρα MDA-MB-231. Η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p53 πιθανόν να σχετίζεται και με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (Qian & Chen, 2013). Πρόσφατα, έχει αναφερθεί το αργίλιο, (με τη μορφή AlCl<sub>3</sub>), επάγει την κυτταρική γήρανση, μέσω της σηματοδοτικής οδού p53 / p21/ Waf1, (Sappino et al., 2012).

Όσο αφορά την επίδραση του ACH στην έκφραση των γονιδίων του c-fos και της κυκλίνης D1, μελέτες μας έδειξαν ότι το ACH προκάλεσε επαγωγή κατά 50% και 60% αντίστοιχα, η οποία είναι μικρότερης έκτασης σε σχέση με αυτήν της E2. Επιπλέον, η αθροιστική δράση της E2 και του ACH στην έκφραση των γονιδίων του c-fos και της κυκλίνης D1, μετά από επώαση δύο και έξι ωρών σε κύτταρα MCF-7 και η εξάλειψη της επίδρασης του ACH στην έκφραση και των δύο γονιδίων παρουσία ICI, υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH. Η ACH-επαγόμενη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης D1 πιθανόν να οφείλεται, εν μέρει τουλάχιστον, στην εμπλοκή του ACH στην ERα σηματοδότηση, δεδομένου ότι η δράση αυτή αναιρείται στα ERα-αρνητικά MDA-MB-231 κύτταρα του μαστού. Από τα παραπάνω, λαμβάνοντας και υπόψη ότι ο p53, η κυκλίνη D1 και ο παράγοντας c-fos είναι σημαντικοί ρυθμιστές της καρκινογένεσης και της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού (Sana & Malik, 2015), συνεπάγεται ότι το ACH ενδέχεται να συμβάλει στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι η πιθανή αύξηση των επιπέδων του c-fos μπορεί να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του ERα, καθώς μελέτες απέδειξαν ότι το 37% των γονιδίων-στόχων του ERα φέρουν τα στοιχεία AP-1 στον υποκινητή τους και ότι πιθανή αύξηση του c-fos αυξάνει αναλογικά τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του ERα (Dahlman-Wright et al., 2012).

Όπως προαναφέρθηκε, πέρα από τον μαστό και η φυσιολογία του νευρικού ιστού φαίνεται να επηρεάζεται από τη συσσώρευση ιόντων αργιλίου. Λαμβάνοντας μάλιστα υπ' όψιν και την νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων (Arevalo et al., 2015; Simpkins et al., 2012; Fiocchetti et al., 2012), οποιαδήποτε παρεμβολή ιόντων αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή της φυσιολογίας του νευρικού ιστού.

Στην πλαίσια της παρούσας διατριβής, αντίστοιχες μελέτες της επίδρασης ACH στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σε SH-SY5Y κύτταρα, έδειξαν ότι επώαση των κυττάρων, με 10<sup>-4</sup> M ACH, για 4 ημέρες, προκάλεσε μείωση κατά 30% των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Η επίδραση αυτή πιθανόν να είναι αποτέλεσμα έμμεσης

δράσης, αποτέλεσμα αρνητικής ρύθμισης των επιπέδων ERβ από τον ERα στον νευρικό ιστό, τα επίπεδα του οποίου σύμφωνα με παρατηρήσεις μας αυξάνονται παρουσία ACH, σε κύτταρα μαστού. Ενδέχεται όμως να οφείλεται και σε επίπεδο ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου ERβ.

Η σχέση "ying-yang" ισχύει κατεξοχήν σε ιστούς, στους οποίους εκφράζονται ταυτόχρονα οι ERα και ERβ (Weihua et al., 2003), εκφράζοντας έτσι τις διαφορετικές βιολογικές δράσεις των δυο ισομορφών. Είναι γνωστό πλέον ότι η αλλαγή του λόγου ERα : ERβ μπορεί να αλλάξει ολόκληρο το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων (Madeira et al., 2013; Shin et al., 2007), χωρίς όμως να είναι γνωστοί οι μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβαίνει αυτή η αλλαγή.

Δεδομένα που υποστηρίζουν την προαναφερθείσα υπόθεση προκύπτουν από μελέτες ελέγχου της επίδρασης του ACH στα επίπεδα mRNA των ERs σε SH-SY5Y κύτταρα, οι οποίες έδειξαν διαφορετική επίδραση του ACH στα επίπεδα mRNA των ERα και ERβ. Συγκεκριμένα κατά την επώαση των SH-SY5Y κυττάρων με  $10^{-4}$ M ACH προκλήθηκε οριακή μείωση των επιπέδων mRNA του ERβ και αύξηση των επιπέδων mRNA του ERα, ενώ επώαση των κυττάρων με  $10^{-9}$ M E2 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων mRNA του ERβ και μείωση των επιπέδων mRNA του ERα. Παρουσία του αναστολέα ICI αναιρείται η μείωση των επιπέδων mRNA του ERβ που παρατηρήθηκε παρουσία του ACH υποδηλώνοντας πιθανή οιστρογονική δράση του ACH. Η δράση αυτή πιθανόν να επιτελείται μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του ERα, δεδομένου ότι παρουσία ICI, μειώνονται τα επίπεδα ERα άρα αίρεται και η ανταγωνιστική δράση του ERα έναντι του ERβ (Pinzone et al., 2004). Παρόμοια δράση (μείωση των επιπέδων mRNA του ERβ) έχει παρατηρηθεί και από άλλα μεταλλοοιστρογόνα, όπως τις ενώσεις του μολύβδου (Taureau et al., 2003). Λαμβάνοντας μάλιστα υπό όψιν και την παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του ERβ παρουσία ACH σε MCF-7 κύτταρα μαστού, υποθέτουμε ότι η δράση του ACH στην ρύθμιση των επιπέδων ERs αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό παρεμβολής του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση, ο οποίος λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα από τον τύπο των κυττάρων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή (Παράγραφος 1.8.11), οι ενώσεις αργιλίου προκαλούν νευροτοξικότητα μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών επαγωγής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες, προάγοντας έτσι και την φλεγμονή των νευρικών κυττάρων.

Η ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών σε νευρικά κύτταρα από ιόντα αργιλίου (Maya et al., 2016) επιβεβαιώθηκε και στα νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y. Επώαση SH-SY5Y κυττάρων με  $10^{-4}$ M ACH οδήγησε σε σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προ-κασπάσης 3 και σχετικά μικρή μείωση των επιπέδων της προ-κασπάσης 9, υποδηλώνοντας επίδραση του ACH σε μηχανισμούς μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης

(Krajewski et al., 1999; Scheubel et al., 2002). Επίσης, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε παρουσία του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bcl-2, δράση η οποία πιθανόν να σχετίζεται με την από ACH-επαγόμενη μείωση των επιπέδων του ERβ, δεδομένου ότι ένας από τους νευροπροστατευτικούς-αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς του ERβ στο νευρικό σύστημα έγκειται στην εμπλοκή του στην επαγωγή της έκφρασης της Bcl-2 (Zhao et al., 2004). Κατά συνέπεια, μείωση των επιπέδων του ERβ πιθανόν να συνεπάγεται μείωση της Bcl2 και εξασθένιση των αντιαποπτωτικών μηχανισμών.

Περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης ιόντων αργιλίου σε μιτοχονδρικές λειτουργίες και ιδιαίτερα σε αυτές που σχετίζονται με επαγωγή απόπτωσης και οξειδωτικού στρες έδειξαν ότι επώαση των SH-SY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος με ACH οδήγησε, πέρα από τη μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων της Bcl-2, και σε μείωση των επιπέδων άλλων αντι-αποπτωτικών μορίων όπως Bcl-xL, αύξηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και σημαντική μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων του κυτοχρώματος c, υποδηλώνοντας απελευθέρωση του στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποίηση μιτοχονδριακών αποπτωτικών μηχανισμών. Επαληθεύοντας έτσι την υπόθεση της επαγωγής από το ACH μιτοχονδριακά ελεγχόμενων αποπτωτικών μηχανισμών και υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση, δεδομένου ότι η μείωση του ERβ στα νευρικά κύτταρα παρουσία του ACH, θα συνεπάγεται και εξασθένιση της νευροπροστατευτικής δράσης αυτού, η οποία σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες εκδηλώνεται, μεταξύ άλλων, με επαγωγή της αύξησης των επιπέδων των Bcl-2 και Bcl-xL και μείωση των επιπέδων της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (Ruddy et al., 2014). Επίσης, παρουσία του ACH παρατηρείται οριακή μείωση των επιπέδων της αντιοξειδωτικής πρωτεΐνης Trx-2, η οποία επίσης υπόκειται σε έμμεσο οιστρογονικό έλεγχο, καθώς ρυθμίζεται από τους παράγοντες p53, NF-κB και τους παράγοντες c-jun/c-fos (Feltz & Roy 2005). Τέλος, σημαντική μείωση παρουσιάζουν και τα μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK παρουσία του ACH στα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Η μιτοχονδριακή PEPCK έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα επιβίωσης των κυττάρων, ειδικά σε συνθήκες μεταβολικού στρες, καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, μέσω της επαγωγής της γλυκονεογένεσης, και παρέχοντας στο κύτταρο πρόδρομα μόρια για να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες (Andres-Mendez et al., 2014). Έτσι, τα μειωμένα επίπεδα της μιτοχονδριακής PEPCK επιβεβαιώνουν την ACH-επαγόμενη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αλλά και των μεταβολικών διεργασιών του κυττάρου.

Εκτιμώντας την επίδραση του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση, και λαμβάνοντας υπ όψιν μελέτες που δείχνουν μιτοχονδριακή εντόπιση των ERs και ιδιαίτερα του ERβ σε διάφορους τύπους κυττάρων (Psarra & Sekeris, 2008, Chen et al., 2009; Liao et al., 2015), ελέγχθηκε η επίδραση του ACH στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ERs τόσο σε κύτταρα του

μαστού (MCF-7, MDA-MB-231) όσο και σε νευρικά κύτταρα (SH-SY5Y). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν επαγωγή περιτυρηνικής εντόπισης τόσο του υποδοχέα ERα σε κύτταρα MCF-7, όσο και του υποδοχέα ERβ σε κύτταρα MCF-7, MDA-MB-231 και SH-SY5Y παρουσία ACH, όμοια με τη δράση του φυσικού οιστρογόνου E2, αλλά σε συγκριτικά μικρότερη έκταση. Όσο αφορά τα κύτταρα MDA-MB-231, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι επειδή δεν εκφράζουν ενδογενώς την ισομορφή ERβ1, αλλά κυρίως την ισομορφή ERβ2 (και δευτερευόντως την ERβ5) (Leygue et al., 1999), ο περιτυρηνικός εντοπισμός του ERβ, που παρατηρείται παρουσία ACH και E2, αντιστοιχεί στην ισομορφή ERβ2. Δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν περιτυρηνική συσσώρευση σε διάφορους τύπους κυττάρων (Okatsu 2010; Al-Mehdi 2012; Lonergan et al., 2007), οι παρατηρήσεις μας υποδεικνύουν ενεργοποίηση της από το ACH της μιτοχονδριακής μετακίνησης των ERs, και ιδιαίτερα του ERβ. Η παρουσία του ERβ στα μιτοχόνδρια προτείνεται να ευνοεί τη μιτοχονδριακή βιογένεση, τη βιοενέργεια και την αντι-αποπτωτική σηματοδότηση (Chen & Yager 2004; Chen et al., 2009; Levin 2009). Μάλιστα, ο από τον ERβ-επαγόμενος οξειδωτικός μεταβολισμός των μιτοχονδρίων σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του μαστού πιθανολογείται να συνδέεται με την ανάπτυξη όγκων (Liao et al., 2015; Martinez-Outschoorn et al., 2011). Οι Liao (2015) Martinez-Outschoorn (2011) και οι συνεργάτες τους προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού από τον ERβ συντελεί στην κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων και στην παροχή των απαραίτητων πρόδρομων μορίων για την ενεργοποίηση βιοσυνθετικών διεργασιών, απαραίτητων για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Έτσι, στην περίπτωση των MCF-7 κυττάρων η αύξηση του μιτοχονδριακού εντοπισμού του ERβ από το ACH, πιθανόν να ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Στο ίδιο πλαίσιο, επιβεβαιώνεται, με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε απομονωμένα μιτοχόνδρια MCF-7 κυττάρων, η ACH-επαγόμενη αύξηση του μιτοχονδριακού ERα και του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2, οι οποίες, σε συνδυασμό με τα επαγόμενα υψηλά επίπεδα p53, να συντελούν στην διατήρηση της μιτοχονδριακής βιωσιμότητας και στην αναστολή αποπτωτικών διεργασιών, πιθανόν ευνοώντας μηχανισμούς κυτταρικής γήρανσης, όπως έχει προταθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Raffetto et al., 2001; Childs et al., 2014; Sappino et al., 2012).

Όσο αφορά την επαγωγή της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ στα κύτταρα SH-SY5Y παρουσία ACH, ενδεχομένως να οδηγεί σε παραγωγή αυξημένων επιπέδων ROS, λόγω υπερλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, και κατά συνέπεια στην παρατηρούμενη ενεργοποίηση των αποπτωτικών διεργασιών στα νευρικά κύτταρα υπό την επίδραση του ACH.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα άλατα του αργιλίου προκαλούν σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα σε κύτταρα του μαστού,

πιθανόν μέσω και της αλληλεπίδρασής τους με φωσφορικές ομάδες του υποδοχέα προκαλώντας είτε τη δημιουργία συσσωματωμάτων ή/και επηρεάζοντας την φωσφορυλίωση του υποδοχέα στο κατάλοιπο της Ser118, παρεμποδίζοντας έτσι την αποδόμηση του και επεμβαίνοντας στην σταθερότητα της πρωτεΐνης. Η αύξηση αυτή μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογίας των κυττάρων του μαστού, καθώς η ERα-εξαρτώμενη έκφραση γονιδίων-στόχων των οιστρογόνων, όπως του p53, του c-fos και της κυκλίνης D1, είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού, αλλά και της κυτταρικής γήρανσης. Επίσης, η ACH-εξαρτώμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα μπορεί να επηρεάσει τους μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης του υποδοχέα. Λόγω της ανταγωνιστικής δράσης της άλφα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων έναντι της βήτα, όσο αφορά τους μηχανισμούς τόσο της ρύθμισης της δραστηριότητάς τους όσο και μηχανισμούς ελέγχου της έκφρασής τους, τα αυξημένα επίπεδα ERα παρουσία ιόντων αργιλίου μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση των επιπέδων και των προστατευτικών δράσεων της βήτα μορφής των υποδοχέων οιστρογόνων. Έτσι τα άλατα του αργιλίου προκαλούν σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων, αλλά και των επιπέδων mRNA, του υποδοχέα ERβ σε νευρικά κύτταρα. Η ACH-εξαρτώμενη μείωση του ERβ, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία, τη λειτουργία αλλά και τη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων, όπως αποδεικνύεται από την ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών και την εξασθένηση αντιαποπτωτικών, αντιοξειδωτικών και μηχανισμών παραγωγής μορίων απαραίτητων για παροχή ενέργειας σε νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Επιπροσθέτως, το αργίλιο, μέσω της επαγωγής του περιπυρηνικού εντοπισμού των υποδοχέων των οιστρογόνων, μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, ενεργοποιώντας μηχανισμούς υπερλειτουργίας των μιτοχονδρίων, που ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή ενέργειας και πρόδρομων μορίων για βιοσυνθετικές πορείες, χρήσιμων και αναγκαίων για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων αλλά και ενδεχομένως αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, λόγω υπερλειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, είτε σε προαγωγή του καρκίνου (Becaria et al., 2002; Maya et al., 2016). Τα ευρήματά μας δεν πιστοποιούν την καρκινογόνα δράση του αργιλίου στα κύτταρα του μαστού. Ωστόσο, η καθημερινή έκθεση στο αργίλιο, σε σχέση με τον πιθανό ρόλο του (ενδοκρινικός διαταράκτης), εγείρει ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια της χρήσης του και την πιθανή νευροεκφυλιστική του δράση.

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης της πιθανής οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου αναδεικνύουν και τον ρόλο των μιτοχονδρίων ως κομβικό σημείο ελέγχου της τύχης του κυττάρου.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ένα πολύπλοκο υποκυτταρικό οργάνιδιο, στο οποίο επιτελούνται σημαντικές μεταβολικές διεργασίες, όπως ο ενεργειακός μεταβολισμός των κυττάρων, η απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες, η βιοσύνθεση μορίων αλλά και η απόπτωση. Η φυσιολογία, η δομή, η λειτουργία ακόμα και ο αριθμός των μιτοχονδρίων σχετίζονται άμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, τη γήρανση και τον κυτταρικό θάνατο και πιθανές μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες έχουν συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως τον καρκίνο, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα και τα μεταβολικά σύνδρομα (Pieczenik & Neustadt, 2007).

Επίσης, το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια φέρουν το δικό τους DNA (mtDNA) αναδεικνύει περισσότερο την σημαντικότητα και την πολυπλοκότητά τους. Το μιτοχονδριακό DNA έχει πολλαπλά αντίγραφα ενός δίκλωνου, κυκλικού μορίου DNA (μεγέθους περίπου 16 kb) και φέρει 37 γονίδια που κωδικοποιούν 13 πρωτεΐνες (από τις 3000 που εντοπίζονται συνολικά στα μιτοχόνδρια). Αξίζει να αναφερθεί ότι στην ρυθμιστική περιοχή D-loop του mtDNA έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί ενισχυτές της μεταγραφής, όπως HREs, CREs και περιοχές AP-1 (Psarra & Sekeris, 2008).

Ταυτόχρονα, έχει ταυτοποιηθεί και ο μιτοχονδριακός εντοπισμός πολλών "πυρηνικών" μεταγραφικών παραγόντων όπως ο p53, ο NF-κB, ο AP-1, ο CREB, ο wnt, ο c-src, ο c-myc, ο c-jun αλλά και πυρηνικών υποδοχέων, όπως ο GR, ο AR και ο ER (κυρίως ο ERβ), σε κύτταρα των ωοθηκών και της μήτρας, των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του φακού, των σπερματοκυττάρων, των πρώιμων και μη-νευρώνων του φλοιού του εγκεφάλου, των νευρώνων του ιππόκαμπου, των πρώιμων καρδιομυοκυττάρων, όπως επίσης και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2, SaOS-2, και MCF-7 (Psarra & Sekeris, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, ο ERβ επιδρά στις μιτοχονδριακές διεργασίες τόσο μέσω των πυρηνικών όσο και μέσω των άμεσων μιτοχονδριακών μηχανισμών δράσης του. Ο ERβ μπορεί να ρυθμίσει την απόπτωση, την απόκριση στο οξειδωτικό στρες, την οξειδωτική φωσφορυλίωση αλλά και τη μεταγραφή του mtDNA είτε άμεσα (μέσω της πρόσδεσης του στη D-loop) είτε έμμεσα μέσω της επαγωγής των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων NRF-1 και Tfam (μέσω των πυρηνικών οδών οιστρογονικής σηματοδότησης) (Scheller & Sekeris 2003).

Θέλοντας να διερευνήσουμε τους μηχανισμούς δράσης του μιτοχονδριακού ERβ και την επίδραση του στις μιτοχονδριακές διεργασίες επιχειρήσαμε να μετασχηματίσουμε κύτταρα νευροβλαστώματος N2A, ώστε να εκφράζουν σταθερά την υβριδική πρωτεΐνη GFP-ERβ μαζί με την αλληλουχία μιτοχονδριακής στόχευσης (mt) καθώς και κύτταρα αναφοράς τα οποία θα εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση. Παρά την αδυναμία απόκτησης αμιγών πληθυσμών κυττάρων, εντοπίστηκαν και αναπτύχθηκαν 2 αποικίες κυττάρων (από το σύνολο των 50 απομονωμένων και ταυτοποιημένων αποικιών)

εμπλουτισμένων κατά περισσότερο από 30% από κύτταρα που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFP-ERβ και δύο αποικίες (από σύνολο 40 αποικιών) κυττάρων εμπλουτισμένων κατά περισσότερο από 50% από κύτταρα που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη mtGFP. Για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των αποικιών μελετήθηκε α) η έκφραση της GFP πρωτεΐνης και η περιπυρηνική-μιτοχονδριακή εντόπιση αυτής, με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού, β) τα επίπεδα mRNA του ERβ με εφαρμογή μεθόδου ποσοτικής PCR, γ) τα πρωτεϊνικά επίπεδα της GFP με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης και δ) στην περίπτωση της επιβεβαίωσης της έκφρασης της χμιαϊκής πρωτεΐνης GFPERβ, εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ και έλεγχο της συνεντόπισης της χρώσης από τη χμιαϊκή πρωτεΐνη με τον μιτοχονδριακό φθορίζων ιχνηθέτη CMX.

Από τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού αποκαλύφθηκε το ότι δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί μια αμιγής αποικία, αλλά πρακτικά απομονώθηκαν υβριδικές αποικίες, οι οποίες αποτελούνται από κύτταρα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες mtGFP και mtGFP-ERβ, και από κύτταρα που δεν τις εκφράζουν, αποτελώντας έτσι κυτταρικές σειρές εμπλουτισμένες ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, N2A-mtGFP και N2A-mtGFPERβ, αντίστοιχα.

Τα κύτταρα N2A-mtGFP και N2A-mtGFPERβ αξιοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για την διερεύνηση της δυνατότητας σύνδεσης του mtGFPERβ σε ERE αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, κυττάρων N2A-mtGFPERβ, καθώς και για τη διερεύνηση της συνομιλίας του ERβ και του παράγοντα μεταγραφής CREB στο μιτοχονδριακό σύμπλοκο μεταγραφής. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή της D-loop, έχουν αναγνωριστεί πιθανά στοιχεία απόκρισης των οιστρογόνων (EREs) καθώς και στοιχεία απόκρισης στο cAMP (CREs), τα οποία αποτελούν, εν δυνάμει, στόχο της μεταγραφικής δραστηριότητας του ERβ. Έτσι, δεδομένου της ύπαρξης τέτοιων στοιχείων στο mtDNA, της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ αλλά και εκτεταμένων αναφορών στην βιβλιογραφία (Chen et al., 2004; Chen et al., 2009) για την επίδραση των ERs στη μεταγραφή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, μελετήθηκε η πρόσδεση του mtERβ σε αυτά τα στοιχεία. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αρχική μας υπόθεση, καθώς ο mtERβ προσδένεται ισχυρά τόσο στην αλληλουχία ERE όσο και στις αλληλουχίες CRE της D-loop, υποδεικνύοντας έναν άμεσο μηχανισμό ρύθμισης του ERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Παρατηρήθηκε ότι η πρόσδεση του mtERβ στα στοιχεία EREs ήταν εντονότερη από την αντίστοιχη πρόσδεση του mtERβ στα στοιχεία CREs. Μάλιστα, όσο αφορά τα στοιχεία CRE παρατηρούμαι ότι το στοιχείο CRE 3 αποτελεί σημαντικό στόχο της οιστρογονικής σηματοδότησης του ERβ στα μιτοχόνδρια, καθώς ο mtERβ προσδένεται, και στο στοιχείο



CRE 3 όσο και σε μία ευρύτερη περιοχή που περιλαμβάνει τα στοιχεία CRE 1 και CRE 2, και CRE 3. Επίσης, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν και το γεγονός της μη-ύπαρξης εσωτερικών αλληλουχιών EREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (δηλαδή εκτός της D-loop), καθώς δεν ανιχνεύθηκε σημαντική σύνδεση του ERβ στα εν δυνάμει EREs, που βρίσκονται στα γονίδια COXI και 12S RNA, επιβεβαιώνοντας το ότι η ρύθμιση της μεταγραφής του mtDNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια επιτελείται μέσω της περιοχής D-loop.

Έχοντας παρατηρήσει τη πρόσδεση του mtERβ σε στοιχεία της D-loop του mtDNA και γνωρίζοντας ότι ο ERβ μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, μελετήθηκε η άμεση επίδραση του mtERβ στα επίπεδα mRNA διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων. Έτσι, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα mRNA των γονιδίων COXI, NDI, ATP8, 16S RNA και CYTB, παρουσία του παράγοντα α-αμανιτίνη (σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς), ο οποίος αναστέλλοντας επιλεκτικά τη λειτουργία της πυρηνικής RNA πολυμεράσης II, μας επιτρέπει να παρατηρήσουμε την ρύθμιση της αμιγούς μιτοχονδριακής μεταγραφής, χωρίς την επίδραση της πυρηνικής μεταγραφής. Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA του πυρηνικά κωδικοποιούμενου γονιδίου COXIV μειώνονται, επιβεβαιώνοντας τη σίγηση της πυρηνικής μεταγραφικής δραστηριότητας. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι ο mtERβ επάγει άμεσα τη μεταγραφή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, αποκαλύπτοντας έναν άμεσο μηχανισμό ρύθμισης της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τον μιτοχονδριακό υποδοχέα των οιστρογόνων.

Συνοπτικά, όσο αφορά το μηχανισμό δράσης του mtERβ στη ρύθμιση της μεταγραφής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση του mtERβ με στοιχεία (EREs και CREs) της D-loop του mtDNA και η άμεση επαγωγή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων COXI, NDI, ATP8, 16S RNA και CYTB, από τον mtERβ.

Στα πλαίσια της μελέτης της δράσης του mtERβ στις μιτοχονδριακές λειτουργίες, μελετήθηκαν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τον mtERβ. Τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν μια μεγάλη δεξαμενή πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τον mtERβ, κάποιες εκ των οποίων συμμετέχουν σε κοινές μεταβολικές-βιολογικές δράσεις ή ακόμα αποτελούν υπομονάδες κοινών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ειδικότερα:

- 1) Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες 60 kDa heat shock protein και Stress-70 protein αποτελούν αμφότερες μέλη των συνοδών πρωτεϊνών υποδηλώνοντας την συμμετοχή τους στην απόκτηση κατάλληλης διαμόρφωσης του υποδοχέα και καθοδήγησής του από το κυτταρόπλασμα προς τα μιτοχόνδρια. Υπάρχουν μελέτες στις οποίες

αναφέρεται η αλληλεπίδραση του (κυτταροπλασματικού) ERβ με αυτές τις πρωτεΐνες (Chen et al., 2007; Simpkins et al., 2008; Ivanova et al., 2011).

- 2) Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες της υπομονάδας B1 του συμπλόκου F(0) της συνθάσης του ATP και των υπομονάδων e και d του συμπλόκου της συνθάσης του ATP, αποτελούν μέλη του συμπλόκου V της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι φαίνεται ότι ο mtERβ μπορεί να ρυθμίσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση αλληλεπιδρώντας άμεσα ή έμμεσα και με την συνθάση του ATP. Υπάρχουν αναφορές, οι οποίες υποστηρίζουν την ρύθμιση του συμπλόκου V από τη πυρηνική δράση του ERβ, επιτρέποντας έτσι τη ρύθμιση των επιπέδων του ATP στο κύτταρο (Alvarez-Delgado et al., 2010). Όμως, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, παρατηρήθηκε η άμεση αλληλεπίδραση του mtERβ με υπομονάδες του συμπλόκου V μέσα στα μιτοχόνδρια, υποδειλώνοντας την άμεση ρύθμιση του mtERβ στην ρύθμιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης.
- 3) Οι πρωτεΐνες Rab, οι οποίες είναι μέλη της υπεροικογένειας μονομερών πρωτεϊνών G (Ras), συμμετέχουν στη ρύθμιση πολλών σταδίων της μετακίνησης κυστιδίων στις μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού κυστιδίων, της μετακίνησης των κυστιδίων κατά μήκος των δικτύων ακτίνης και τουμπουλίνης και της μεμβρανικής σύντηξης. Μια ακόμα πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύτηκε να αλληλεπιδρά με τον mtERβ είναι ο κατιόν-εξαρτώμενος υποδοχέας της 6-φωσφορικής μαννόζης, ο οποίος αποτελεί μια πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφορυλιωμένων λυσοσωμικών ενζύμων από το σύμπλεγμα Golgi και την κυτταρική μεμβράνη προς στα λυσοσώματα. Τα λυσοσωμικά ένζυμα που φέρουν φωσφο-μαννοζυλικά κατάλοιπα δεσμεύονται ειδικά στους υποδοχείς της 6-φωσφορικής μαννόζης στο σύμπλεγμα Golgi και το προκύπτον σύμπλοκο μεταφέρεται σε λυσοσώματα (Hutagalung & Novick, 2011). Ο ρόλος τους σε σχέση με τον mtERβ μπορεί να αφορά: A) την μετακίνηση κάποιων πρωτεϊνών (όπως του GR, του RXR και της p53) στα μιτοχόνδρια. Αναγκαία, είναι η πέψη των πρωτεϊνών, σε κυστίδια όπως τα λυσοσώματα, ώστε να "ενεργοποιηθεί" η κρυπτική αλληλουχία μιτοχονδριακού εντοπισμού. Έτσι, ένα σενάριο αποτελεί η συμπλοκοποίηση στο κυτταρόπλασμα αυτών των πρωτεϊνών με τον mtERβ, έτσι ώστε ο mtERβ να τροποποιηθεί και να μετακινηθεί εντός των μιτοχονδρίων (Yogev & Pines, 2011), B) ένα δεύτερο σενάριο εμπλέκει την αλληλεπίδραση αυτών των πρωτεϊνών με τον mtERβ, έτσι ώστε ο δεύτερος να αποδομηθεί από το κύτταρο, σαν απόκριση στην αυξημένη οιστρογονική δράση του mtERβ. Αξίζει να αναφερθεί, ότι ένα παρόμοιο φαινόμενο, δηλαδή την συσσώρευση της υβριδικής πρωτεΐνης mtGFP-ERβ σε κυστίδια, παρατηρήσαμε και κατά τη απόπειρα δημιουργίας της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231 ώστε να εκφράζει την πρωτεΐνη mtGFP-ERβ.

- 4) Επίσης, ταυτοποιήθηκε η αλληλεπίδραση του ERβ με την πρωτεΐνη του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT 3. Αυτή η πρωτεΐνη επάγει τη μεταφορά γλυκόζης και βρίσκεται κυρίως στα νευρικά κύτταρα, όπως τα N2A (Shin et al., 2004). Έτσι, φαίνεται ότι ο mtERβ μπορεί να επηρεάσει τον μεταβολισμό της γλυκόζης και την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, συνυπολογίζοντας επίσης και την αλληλεπίδρασή του με την συνθάση του ATP.
- 5) Τέλος, ταυτοποιήθηκε και η αλληλεπίδραση του mtERβ με την πρωτεΐνη μεταφοράς Na/K (Sodium/potassium-transporting ATPase), η οποία ρυθμίζει τα επίπεδα νατρίου και καλίου αλλά και με το αντιγόνο CD63, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών (Clausen et al., 2017; Hemler, 2005). Έτσι, ο mtERβ φαίνεται ότι ρυθμίζει την ομοιοστάση των κυττάρων και υποκυτταρικών συστατικών μέσω του ελέγχου των επιπέδων νατρίου και καλίου. Επίσης, επειδή δεν γνωρίζουμε αρκετά για τις βιολογικές δράσεις και τους μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν οι τετρασπανίνες, δεν μπορεί να αξιολογηθεί και να ερμηνευθεί ο ρόλος της αλληλεπίδρασης του mtERβ με το αντιγόνο CD63.

Συνοπτικά, παρατηρούμαι ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας των οιστρογόνων μπορεί να επηρεάσει τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό, τόσο μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής του mtDNA όσο και μέσω των αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες. Φυσικά, μένουν να διερευνηθούν πολλές πτυχές και μηχανισμοί της ρύθμισης των μιτοχονδριακών διεργασιών μέσω του mtERβ. Αναμφίβολα, όμως, αναδεικνύονται οι ρόλοι των υποδοχέων οιστρογόνων μέσω της απευθείας δράσης τους στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού κυτταρικού μεταβολισμού και μιτοχονδριακά ελεγχόμενων κυτταρικών διεργασιών. Η κατανόηση του ρόλου των υποδοχέων των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια και η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης τους μπορεί να συντελέσει στην κατανόηση της μοριακής βάσης ασθενειών, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες και στην πιθανή αντιμετώπισή τους, αλλά και στην συμβολή των οιστρογόνων στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών.

## 5. Βιβλιογραφία

- Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2014). Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17beta-estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol*, 389(1-2), 48-57. doi: 10.1016/j.mce.2014.01.009
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell*, 16(1), 231-237. doi: 10.1091/mbc.E04-07-0547
- Acconcia, F., Bocedi, A., Ascenzi, P., & Marino, M. (2003). Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *IUBMB Life*, 55(1), 33-35. doi: 10.1080/1521654031000081256
- Acconcia, F., & Kumar, R. (2006). Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett*, 238(1), 1-14. doi: 10.1016/j.canlet.2005.06.018
- Acconcia, F., Totta, P., Ogawa, S., Cardillo, I., Inoue, S., Leone, S., Marino, M. (2005). Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol*, 203(1), 193-201. doi: 10.1002/jcp.20219
- Acevedo, M. L., & Kraus, W. L. (2004). Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem*, 40, 73-88
- Ascenzi, P., di Masi, A., Leboffe, L., Fiocchetti, M., Nuzzo, M. T., Brunori, M., & Marino, M. (2016). Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Mol Aspects Med*, 52, 1-48. doi: 10.1016/j.mam.2016.10.004
- Albini, A., Rosano, C., Angelini, G., Amaro, A., Esposito, A. I., Maramotti, S., Pfeffer, U. (2014). Exogenous hormonal regulation in breast cancer cells by phytoestrogens and endocrine disruptors. *Curr Med Chem*, 21(9), 1129-1145
- Alexaki, V. I., Charalampopoulos, I., Kampa, M., Nifli, A. P., Hatzoglou, A., Gravanis, A., & Castanas, E. (2006). Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 98(2-3), 97-110. doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.08.017
- Al-Mehdi, A. B., Pastukh, V. M., Swiger, B. M., Reed, D. J., Patel, M. R., Bardwell, G. C., Gillespie, M. N. (2012). Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci Signal*, 5(231), ra47. doi: 10.1126/scisignal.2002712
- Alvarez-Delgado, C., Mendoza-Rodriguez, C. A., Picazo, O., & Cerbon, M. (2010). Different expression of alpha and beta mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: interaction with respiratory complex V. *Exp Gerontol*, 45(7-8), 580-585. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.015
- Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*, 4(5), 197-201
- Ansonoff, M. A., & Etgen, A. M. (1998). Estradiol elevates protein kinase C catalytic activity in the preoptic area of female rats. *Endocrinology*, 139(7), 3050-3056. doi: 10.1210/endo.139.7.6088
- Anstead, G. M., Carlson, K. E., & Katzenellenbogen, J. A. (1997). The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*, 62(3), 268-303

- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci*, 16(1), 17-29. doi: 10.1038/nrn3856
- Ascenzi, P., Bocedi, A., & Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med*, 27(4), 299-402. doi: 10.1016/j.mam.2006.07.001
- Azcoitia, I., Fernandez-Galaz, C., Sierra, A., & Garcia-Segura, L. M. (1999). Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol*, 28(9), 699-710
- Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S., Harada, N., & Garcia-Segura, L. M. (2001). Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol*, 47(4), 318-329
- Bai, X. Y., & Shen, H. (2008). Mutational analysis of thyroid transcription factor-1 gene (TTF-1) in lung carcinomas. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 44(1-2), 17-25. doi: 10.1007/s11626-007-9062-0
- Bardin, A., Boule, N., Lazennec, G., Vignon, F., & Pujol, P. (2004). Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11(3), 537-551
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56(3), 335-344.
- Beato, M., Herrlich, P., & Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83(6), 851-857
- Becaria, A., Campbell, A., & Bondy, S. C. (2002). Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health*, 18(7), 309-320. doi: 10.1191/0748233702th157oa
- Belcredito, S., Brusadelli, A., & Maggi, A. (2000). Estrogens, apoptosis and cells of neural origin. *J Neurocytol*, 29(5-6), 359-365
- Berco, M., & Bhavnani, B. R. (2001). Differential neuroprotective effects of equine estrogens against oxidized low density lipoprotein-induced neuronal cell death. *J Soc Gynecol Investig*, 8(4), 245-254
- Berger, C., Qian, Y., & Chen, X. (2013). The p53-estrogen receptor loop in cancer. *Curr Mol Med*, 13(8), 1229-1240
- Berry, M., Metzger, D., & Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, 9(9), 2811-2818
- Bijlmakers, M. J., & Marsh, M. (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol*, 13(1), 32-42
- Bjornstrom, L., & Sjoberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, 19(4), 833-842. doi: 10.1210/me.2004-0486
- Bloom, D., Dhakshinamoorthy, S., & Jaiswal, A. K. (2002). Site-directed mutagenesis of cysteine to serine in the DNA binding region of Nrf2 decreases its capacity to upregulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene*, 21(14), 2191-2200. doi: 10.1038/sj.onc.1205288
- Bondy, S. C., Ali, S. F., & Guo-Ross, S. (1998). Aluminum but not iron treatment induces pro-oxidant events in the rat brain. *Mol Chem Neuropathol*, 34(2-3), 219-232.
- Bondy, S. C., Guo-Ross, S. X., & Pien, J. (1998). Mechanisms underlying the aluminum-induced potentiation of the pro-oxidant properties of transition metals. *Neurotoxicology*, 19(1), 65-71
- Bondy, S. C., & Kirstein, S. (1996). The promotion of iron-induced generation of reactive oxygen species in nerve tissue by aluminum. *Mol Chem Neuropathol*, 27(2), 185-194. doi: 10.1007/BF02815093
- Borras, C., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F. V., & Vina, J. (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*, 34(5), 546-552

- Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Mader, S. (2004). Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol*, 18(6), 1411-1427. doi: 10.1210/me.2003-0441
- Brune, B., & Mohr, S. (2001). Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and caspase-3 by nitric oxide. *Curr Protein Pept Sci*, 2(1), 61-72.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O. Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753-758. doi: 10.1038/39645
- Byrne, C., Divekar, S. D., Storch, G. B., Parodi, D. A., & Martin, M. B. (2009). Cadmium--a metalloestrogen? *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 266-271. doi: 10.1016/j.taap.2009.03.025
- Cam, H., Balciunaite, E., Blais, A., Spektor, A., Scarpulla, R. C., Young, R., Dynlacht, B. D. (2004). A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell*, 16(3), 399-411. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.037
- Campbell, A., & Bondy, S. C. (2000). Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: a role for the metal in Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46(4), 721-730
- Campbell, A., Hamai, D., & Bondy, S. C. (2001). Differential toxicity of aluminum salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration. *Neurotoxicology*, 22(1), 63-71
- Campbell, A., Prasad, K. N., & Bondy, S. C. (1999). Aluminum-induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1166-1171
- Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L. M., & Wandosell, F. (2004). Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci*, 25(3), 363-373. doi: 10.1016/j.mcn.2003.10.008
- Carroll, J. S., & Brown, M. (2006). Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*, 20(8), 1707-1714. doi: 10.1210/me.2005-0334
- Carswell, H. V., Dominiczak, A. F., Garcia-Segura, L. M., Harada, N., Hutchison, J. B., & Macrae, I. M. (2005). Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 96(1), 89-91. doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.02.016
- Carswell, H. V., Macrae, I. M., Gallagher, L., Harrop, E., & Horsburgh, K. J. (2004). Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(4), H1501-1504. doi: 10.1152/ajpheart.00227.2004
- Castro-Rivera, E., Samudio, I., & Safe, S. (2001). Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem*, 276(33), 30853-30861. doi: 10.1074/jbc.M103339200
- Chambliss, K. L., & Shaul, P. W. (2002). Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids*, 67(6), 413-419
- Chen, D., Pace, P. E., Coombes, R. C., & Ali, S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*, 19(2), 1002-1015
- Chen, D., Washbrook, E., Sarwar, N., Bate, G., Pace, P., Thirunavakkarasu, V., Taylor, J., Epstein, R., Fuller-Pace, F., Egly, J.M., Coombes, J., Ali, S. (2002). Phosphorylation of human estrogen receptor  $\alpha$  at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* (21), 4921-4931
- Chen, J., Delannoy, M., Odwin, S., He, P., Trush, M. A., & Yager, J. D. (2003). Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicol Sci*, 75(2), 271-278. doi: 10.1093/toxsci/kfg183

- Chen, J. Q., Brown, T. R., & Yager, J. D. (2008). Mechanisms of hormone carcinogenesis: evolution of views, role of mitochondria. *Adv Exp Med Biol*, 630, 1-18
- Chen, J. Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P., & Yager, J. D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim Biophys Acta*, 1793(10), 1540-1570. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.06.001
- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C., & Yager, J. D. (2004). Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286(6), E1011-1022. doi: 10.1152/ajpendo.00508.2003
- Chen, J. Q., Yager, J. D., & Russo, J. (2005). Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*, 1746(1), 1-17. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.08.001
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*, 15(11), 1139-1153. doi: 10.15252/embr.201439245
- Cirillo, F., Nassa, G., Tarallo, R., Stellato, C., De Filippo, M. R., Ambrosino, C., Weisz, A. (2013). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator activity in human breast cancer cells: identification of novel nuclear cofactors of antiestrogen-ERalpha complexes by interaction proteomics. *J Proteome Res*, 12(1), 421-431. doi: 10.1021/pr300753u
- Clausen, M. V., Hilbers, F., & Poulsen, H. (2017). The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol*, 8, 371. doi: 10.3389/fphys.2017.00371
- Cogswell, P. C., Kashatus, D. F., Keifer, J. A., Guttridge, D. C., Reuther, J. Y., Bristow, C., Baldwin, A. S., Jr. (2003). NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem*, 278(5), 2963-2968. doi: 10.1074/jbc.M209995200
- Conner, P. (2007). Breast response to menopausal hormone therapy--aspects on proliferation, apoptosis and mammographic density. *Ann Med*, 39(1), 28-41. doi: 10.1080/07853890601039842
- Corain, B., Bombi, G. G., Tapparo, A., Nicolini, M., Zatta, P., Perazzolo, M., & Favarato, M. (1990). Alzheimer's disease and aluminum toxicology. *Environ Health Perspect*, 89, 233-235
- Christensen, A., & Micevych, P. (2013). A Novel Membrane Estrogen Receptor Activated by STX Induces Female Sexual Receptivity through an Interaction with mGluR1a. *Neuroendocrinology*, 97(4), 363-368. doi: 10.1159/000351077
- Cui, Y., Zhang, M., Pestell, R., Curran, E. M., Welshons, W. V., & Fuqua, S. A. (2004). Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res*, 64(24), 9199-9208. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2126
- Cui, J., Wang, Y., Dong, Q., Wu, S., Xiao, X., Hu, J., Zhang, Y. (2011). Morphine protects against intracellular amyloid toxicity by inducing estradiol release and upregulation of Hsp70. *J Neurosci*, 31(45), 16227-16240. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3915-11.2011
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, 19(3), 197-209. doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007
- Darbre, P. D. (2005). Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem*, 99(9), 1912-1919. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.06.001
- Darbre, P. D. (2006a). Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20(1), 121-143. doi: 10.1016/j.beem.2005.09.007
- Darbre, P. D. (2006b). Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J Appl Toxicol*, 26(3), 191-197. doi: 10.1002/jat.1135

- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11(1), 1-12
- DeVoto, E., & Yokel, R. A. (1994). The biological speciation and toxicokinetics of aluminum. *Environ Health Perspect*, 102(11), 940-951
- Dhandapani, K. M., Wade, F. M., Mahesh, V. B., & Brann, D. W. (2005). Astrocyte-derived transforming growth factor- $\beta$  mediates the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*, 146(6), 2749-2759. doi: 10.1210/en.2005-0014
- Ding, F., Yao, J., Zhao, L., Mao, Z., Chen, S., & Brinton, R. D. (2013). Ovariectomy induces a shift in fuel availability and metabolism in the hippocampus of the female transgenic model of familial Alzheimer's. *PLoS One*, 8(3), e59825. doi: 10.1371/journal.pone.0059825
- Divekar, S. D., Storchan, G. B., Sperle, K., Veselik, D. J., Johnson, E., Dakshanamurthy, S., Martin, M. B. (2011). The role of calcium in the activation of estrogen receptor- $\alpha$ . *Cancer Res*, 71(5), 1658-1668. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1899
- DonCarlos, L. L., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2009). Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1, S113-122. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.04.012
- Dos Santos, E. G., Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Le Moal, V., Giudicelli, Y., & Lacasa, D. (2002). Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology*, 143(3), 930-940. doi: 10.1210/endo.143.3.8678
- Duan, R., Porter, W., & Safe, S. (1998). Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology*, 139(4), 1981-1990. doi: 10.1210/endo.139.4.5870
- Dubal, D. B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S. W., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Wise, P. M. (2001). Estrogen receptor  $\alpha$ , not  $\beta$ , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4), 1952-1957. doi: 10.1073/pnas.041483198
- Dutertre, M., & Smith, C. L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther*, 295(2), 431-437
- Ejima, K., Nanri, H., Araki, M., Uchida, K., Kashimura, M., & Ikeda, M. (1999). 17 $\beta$ -estradiol induces protein thiol/disulfide oxidoreductases and protects cultured bovine aortic endothelial cells from oxidative stress. *Eur J Endocrinol*, 140(6), 608-613.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol Cell Biol*, 19(8), 5363-5372
- Exley, C. (1999). A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer's disease? *J Inorg Biochem*, 76(2), 133-140
- Exley, C., Burgess, E., Day, J. P., Jeffery, E. H., Melethil, S., & Yokel, R. A. (1996). Aluminum toxicokinetics. *J Toxicol Environ Health*, 48(6), 569-584
- Fan, M., Park, A., & Nephew, K. P. (2005). CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol*, 19(12), 2901-2914. doi: 10.1210/me.2005-0111
- Farooq, A. (2015). Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Curr Top Med Chem*, 15(14), 1372-1384
- Faus, H., & Haendler, B. (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother*, 60(9), 520-528. doi: 10.1016/j.biopha.2006.07.082
- Felty, Q., & Roy, D. (2005). Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *J Carcinog*, 4(1), 1. doi: 10.1186/1477-3163-4-1
- Figtree, G. A., McDonald, D., Watkins, H., & Channon, K. M. (2003). Truncated estrogen receptor  $\alpha$  46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation*, 107(1), 120-126



- Fiocchetti, M., Ascenzi, P., & Marino, M. (2012). Neuroprotective effects of 17beta-estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Front Physiol*, 3, 73. doi: 10.3389/fphys.2012.00073
- Flarend, R., Bin, T., Elmore, D., & Hem, S. L. (2001). A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem Toxicol*, 39(2), 163-168
- Foster, J. S., Henley, D. C., Ahamed, S., & Wimalasena, J. (2001). Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 12(7), 320-327
- Galien, R., & Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res*, 25(12), 2424-2429
- Garcia-Segura, L. M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J. R., Hutchison, R. E., & Hutchison, J. B. (1999). Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89(2), 567-578
- Gatson, J. W., Simpkins, J. W., Yi, K. D., Idris, A. H., Minei, J. P., & Wigginton, J. G. (2011). Aromatase is increased in astrocytes in the presence of elevated pressure. *Endocrinology*, 152(1), 207-213. doi: 10.1210/en.2010-0724
- Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., & Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell*, 63(6), 1267-1276
- Geraldes, P., Sirois, M. G., & Tanguay, J. F. (2003). Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res*, 93(5), 399-405. doi: 10.1161/01.RES.0000088640.18462.42
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4), 685-704. doi: 10.1124/pr.58.4.2
- Ghisletti, S., Meda, C., Maggi, A., & Vegeto, E. (2005). 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol*, 25(8), 2957-2968. doi: 10.1128/MCB.25.8.2957-2968.2005
- Ghribi, O., Herman, M. M., DeWitt, D. A., Forbes, M. S., & Savory, J. (2001). Abeta(1-42) and aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of gadd 153 and NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res*, 96(1-2), 30-38
- Ghosh, P., Dahms, N. M., & Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(3), 202-212. doi: 10.1038/nrm1050
- Ghosh, P., & Kornfeld, S. (2004). The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol*, 83(6), 257-262. doi: 10.1078/0171-9335-00374
- Gingerich, S., Kim, G. L., Chalmers, J. A., Koletar, M. M., Wang, X., Wang, Y., & Belsham, D. D. (2010). Estrogen receptor alpha and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17beta-estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience*, 170(1), 54-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.076
- Gollapudi, L., & Oblinger, M. M. (1999). Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ERalpha-transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res*, 56(5), 471-481. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990601)56:5<471::AID-JNR3>3.0.CO;2-1
- Gottipati, S., & Cammarata, P. R. (2008). Mitochondrial superoxide dismutase activation with 17 beta-estradiol-treated human lens epithelial cells. *Mol Vis*, 14, 898-905
- Greger, J. G., Guo, Y., Henderson, R., Ross, J. F., & Cheskis, B. J. (2006). Characterization of MNAR expression. *Steroids*, 71(4), 317-322. doi: 10.1016/j.steroids.2005.09.016
- Gugneja, S., Virbasius, C. M., & Scarpulla, R. C. (1996). Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol Cell Biol*, 16(10), 5708-5716
- Grisouard, J., Medunjanin, S., Hermani, A., Shukla, A., Mayer, D. (2007). Glycogen Synthase

- Kinase-3 protects estrogen receptor from proteasomal degradation and is required for full transcriptional activity of the receptor. *Molecular Endocrinology* 21(10):2427–2439
- Gupta, R. K. (1998). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*, 32(3), 155-172
- Gupte, A. A., Pownall, H. J., & Hamilton, D. J. (2015). Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *J Diabetes Res*, 2015, 916585. doi: 10.1155/2015/916585
- Halaby, M. J., & Yang, D. Q. (2007). p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics. *Gene*, 395(1-2), 1-7. doi: 10.1016/j.gene.2007.01.029
- Hall, J. M., McDonnell, D. P., & Korach, K. S. (2002). Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*, 16(3), 469-486. doi: 10.1210/mend.16.3.0814
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59(5), 1609-1623
- Han, S. J., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2009). Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab*, 20(1), 8-15. doi: 10.1016/j.tem.2008.10.001
- Harris, W. R., Berthon, G., Day, J. P., Exley, C., Flaten, T. P., Forbes, W. F., Zatta, P. F. (1996). Speciation of aluminum in biological systems. *J Toxicol Environ Health*, 48(6), 543-568
- Hayashi, S., Sakamoto, T., Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., & Yamaguchi, Y. (2003). Estrogen and growth factor signaling pathway: basic approaches for clinical application. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86(3-5), 433-442
- Hayashi, S. I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yamaguchi, Y. (2003). The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer*, 10(2), 193-202
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Gustafsson, J. A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*, 87(3), 905-931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10), 801-811. doi: 10.1038/nrm1736
- Hennessy, B. A., Harvey, B. J., & Healy, V. (2005). 17beta-Estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 229(1-2), 39-47. doi: 10.1016/j.mce.2004.10.001
- Hensley, K., Butterfield, D. A., Hall, N., Cole, P., Subramaniam, R., Mark, R., et al. (1996). Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann N Y Acad Sci*, 786, 120-134
- Herrick, S. P., Waters, E. M., Drake, C. T., McEwen, B. S., & Milner, T. A. (2006). Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. *Brain Res*, 1121(1), 46-58. doi: 10.1016/j.brainres.2006.08.084
- Hidalgo, A. (2014). Nuclear Receptors and Clearance of Apoptotic Cells: Stimulating the Macrophage's Appetite. *Front Immunol*, 5, 211. doi: 10.3389/fimmu.2014.00211
- Hsieh, Y. C., Yang, S., Choudhry, M. A., Yu, H. P., Rue, L. W., 3rd, Bland, K. I., & Chaudry, I. H. (2005). PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(6), H2665-2672. doi: 10.1152/ajpheart.00682.2005
- Hsieh, Y. C., Yu, H. P., Suzuki, T., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., Bland, K. I., & Chaudry, I. H. (2006). Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol*, 41(3), 511-521. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.06.001

- Huang, W.Y., Newman, B., Millikan, R., Schell, M.J., Hulka, B., Moorman, P. (2000). Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91(1), 119-149. doi: 10.1152/physrev.00059.2009
- Incerpi, S., D'Arezzo, S., Marino, M., Musanti, R., Pallottini, V., Pascolini, A., & Trentalance, A. (2003). Short-term activation by low 17beta-estradiol concentrations of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in rat aortic smooth muscle cells: physiopathological implications. *Endocrinology*, 144(10), 4315-4324. doi: 10.1210/en.2003-0495
- Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Kato, S. (2004). In vivo potentiation of human oestrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes Cells*, 9(10), 983-992. doi: 10.1111/j.1365-2443.2004.00777.x
- Ivanova, M., Abner, S., Pierce, W., Jr., & Klinge, C. (2011). Ligand-dependent differences in estrogen receptor beta-interacting proteins identified in lung adenocarcinoma cells corresponds to estrogenic responses. *Proteome Sci*, 9(1), 60. doi: 10.1186/1477-5956-9-60
- Jaber, B. M., Gao, T., Huang, L., Karmakar, S., & Smith, C. L. (2006). The pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780 promotes a novel interaction of estrogen receptor-alpha with the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein-binding protein/p300 coactivators. *Mol Endocrinol*, 20(11), 2695-2710. doi: 10.1210/me.2005-0218
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. A. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29(4), 557-568. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.008
- Johann, S., & Beyer, C. (2013). Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 137, 71-81. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.11.006
- Johansson, L., Bavner, A., Thomsen, J. S., Farnegardh, M., Gustafsson, J. A., & Treuter, E. (2000). The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Mol Cell Biol*, 20(4), 1124-1133
- Johnson, V. J., & Sharma, R. P. (2003). Aluminum disrupts the pro-inflammatory cytokine/neurotrophin balance in primary brain rotation-mediated aggregate cultures: possible role in neurodegeneration. *Neurotoxicology*, 24(2), 261-268. doi: 10.1016/S0161-813X(02)00194-8
- Johnston, S. J., & Cheung, K. L. (2010). Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr Med Chem*, 17(10), 902-914
- Jones, D. L., & Kochian, L. V. (1997). Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Lett*, 400(1), 51-57
- Jouhanneau, P., Lacour, B., Raisbeck, G., Yiou, F., Banide, H., Brown, E., & Drueke, T. (1993). Gastrointestinal absorption of aluminum in rats using 26Al and accelerator mass spectrometry. *Clin Nephrol*, 40(4), 244-248
- Julka, D., & Gill, K. D. (1996). Effect of aluminum on regional brain antioxidant defense status in Wistar rats. *Res Exp Med (Berl)*, 196(3), 187-194
- Jung, M. E., Rewal, M., Perez, E., Wen, Y., & Simpkins, J. W. (2004). Estrogen protects against brain lipid peroxidation in ethanol-withdrawn rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 79(3), 573-586. doi: 10.1016/j.pbb.2004.09.007
- Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., & Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, 275(24), 18447-18453. doi: 10.1074/jbc.M910345199
- Kampa, M., & Castanas, E. (2006). Membrane steroid receptor signaling in normal and neoplastic cells. *Mol Cell Endocrinol*, 246(1-2), 76-82. doi: 10.1016/j.mce.2005.11.018

- Kampa, M., Pelekanou, V., Notas, G., Stathopoulos, E. N., & Castanas, E. (2013). The estrogen receptor: two or more molecules, multiple variants, diverse localizations, signaling and functions. Are we undergoing a paradigm-shift as regards their significance in breast cancer? *Hormones (Athens)*, 12(1), 69-85
- Kato, S., Tora, L., Yamauchi, J., Masushige, S., Bellard, M., & Chambon, P. (1992). A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell*, 68(4), 731-742
- Katzenellenbogen, B. S., & Katzenellenbogen, J. A. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2(5), 335-344
- Kaufmann, S. H., & Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*, 11(12), 526-534
- Kawahara, M., & Kato-Negishi, M. (2011). Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 276393. doi: 10.4061/2011/276393
- Kelly, D. P., & Scarpulla, R. C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*, 18(4), 357-368. doi: 10.1101/gad.1177604
- Kerdivel, G., Habauzit, D., & Pakdel, F. (2013). Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *Int J Endocrinol*, 2013, 501851. doi: 10.1155/2013/501851
- Kim, K. H., & Bender, J. R. (2005). Rapid, estrogen receptor-mediated signaling: why is the endothelium so special? *Sci STKE*, 2005(288), pe28. doi: 10.1126/stke.2882005pe28
- Kim, M. Y., Woo, E. M., Chong, Y. T., Homenko, D. R., & Kraus, W. L. (2006). Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol*, 20(7), 1479-1493. doi: 10.1210/me.2005-0531
- Klinge, C. M., Blankenship, K. A., Risinger, K. E., Bhatnagar, S., Noisin, E. L., Sumanasekera, W. K., Keynton, R. S. (2005). Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem*, 280(9), 7460-7468. doi: 10.1074/jbc.M411565200
- Ko, L., Cardona, G. R., Iwasaki, T., Bramlett, K. S., Burris, T. P., & Chin, W. W. (2002). Ser-884 adjacent to the LXXLL motif of coactivator TRBP defines selectivity for ERs and TRs. *Mol Endocrinol*, 16(1), 128-140. doi: 10.1210/mend.16.1.0755
- Kong, E. H., Heldring, N., Gustafsson, J. A., Treuter, E., Hubbard, R. E., & Pike, A. C. (2005). Delineation of a unique protein-protein interaction site on the surface of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(10), 3593-3598. doi: 10.1073/pnas.0407189102
- Koski, C. L., Hila, S., & Hoffman, G. E. (2004). Regulation of cytokine-induced neuron death by ovarian hormones: involvement of antiapoptotic protein expression and c-JUN N-terminal kinase-mediated proapoptotic signaling. *Endocrinology*, 145(1), 95-103. doi: 10.1210/en.2003-0803
- Kostanyan, A., & Nazaryan, K. (1992). Rat brain glycolysis regulation by estradiol-17 beta. *Biochim Biophys Acta*, 1133(3), 301-306
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10), 5752-5757
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12), 5925-5930.
- Kumar, R., & Thompson, E. B. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*, 17(1), 1-10. doi: 10.1210/me.2002-0258

- Kupzig, S., Walker, S. A., & Cullen, P. J. (2005). The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(21), 7577-7582. doi: 10.1073/pnas.0409611102
- Labi, V., Grespi, F., Baumgartner, F., & Villunger, A. (2008). Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ*, 15(6), 977-987. doi: 10.1038/cdd.2008.37
- Lannigan, D. A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, 68(1), 1-9.
- Larsson, N. G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Clayton, D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, 18(3), 231-236. doi: 10.1038/ng0398-231
- Lean, J. M., Davies, J. T., Fuller, K., Jagger, C. J., Kirstein, B., Partington, G. A., . Chambers, T. J. (2003). A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest*, 112(6), 915-923. doi: 10.1172/JCI18859
- Lee, J., Kim, C. H., Simon, D. K., Aminova, L. R., Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Ratan, R. R. (2005). Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J Biol Chem*, 280(49), 40398-40401. doi: 10.1074/jbc.C500140200
- Lee, J., Sharma, S., Kim, J., Ferrante, R. J., & Ryu, H. (2008). Mitochondrial nuclear receptors and transcription factors: who's minding the cell? *J Neurosci Res*, 86(5), 961-971. doi: 10.1002/jnr.21564
- Lee, S. J., & McEwen, B. S. (2001). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 569-591. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.569
- Leung, Y. K., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S. M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(35), 13162-13167. doi: 10.1073/pnas.0605676103
- Levin, E. R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*, 19(8), 1951-1959. doi: 10.1210/me.2004-0390
- Lewandowski, S., Kalita, K., & Kaczmarek, L. (2002). Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett*, 524(1-3), 1-5
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P. H., & Murphy, L. C. (1999). Expression of estrogen receptor beta1, beta2, and beta5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res*, 59(6), 1175-1179
- Li, C., Briggs, M. R., Ahlborn, T. E., Kraemer, F. B., & Liu, J. (2001). Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology*, 142(4), 1546-1553. doi: 10.1210/endo.142.4.8096
- Li, J., Siegel, M., Yuan, M., Zeng, Z., Finnucan, L., Persky, R., McCullough, L. D. (2011). Estrogen enhances neurogenesis and behavioral recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(2), 413-425. doi: 10.1038/jcbfm.2010.181
- Li, L., Li, Z., Howley, P. M., & Sacks, D. B. (2006). E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *J Biol Chem*, 281(4), 1978-1985. doi: 10.1074/jbc.M508545200
- Liang, M., & Nilsson, B. O. (2004). Proteasome-dependent degradation of ERalpha but not ERbeta in cultured mouse aorta smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol*, 224(1-2), 65-71. doi: 10.1016/j.mce.2004.06.012
- Liao, T. L., Tzeng, C. R., Yu, C. L., Wang, Y. P., & Kao, S. H. (2015). Estrogen receptor-beta in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1350, 52-60. doi: 10.1111/nyas.12872
- Lindell, T. J., Weinberg, F., Morris, P. W., Roeder, R. G., & Rutter, W. J. (1970). Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science*, 170(3956), 447-449

- Lipfert, L., Fisher, J. E., Wei, N., Scafonas, A., Su, Q., Yudkovitz, J., Reszka, A. A. (2006). Antagonist-induced, activation function-2-independent estrogen receptor alpha phosphorylation. *Mol Endocrinol*, 20(3), 516-533. doi: 10.1210/me.2005-0190
- Liu, M. M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., Kushner, P. J. (2002). Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*, 277(27), 24353-24360. doi: 10.1074/jbc.M201829200
- Liu, X., Fan, X. L., Zhao, Y., Luo, G. R., Li, X. P., Li, R., & Le, W. D. (2005). Estrogen provides neuroprotection against activated microglia-induced dopaminergic neuronal injury through both estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in microglia. *J Neurosci Res*, 81(5), 653-665. doi: 10.1002/jnr.20583
- Liu, Z., Yu, X., & Shaikh, Z. A. (2008). Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 228(3), 286-294. doi: 10.1016/j.taap.2007.12.017
- Liu, C., Zhang, H., Shuang, C., Lu, Y., Jin, F., Xu, H., & Lu, P. (2010). Alterations of ER, PR, HER-2/neu, and P53 protein expression in ductal breast carcinomas and clinical implications. *Med Oncol*, 27(3), 747-752. doi: 10.1007/s12032-009-9279-8
- Liu, W., Ip, M. M., Podgorsak, M. B., & Das, G. M. (2009). Disruption of estrogen receptor alpha-p53 interaction in breast tumors: a novel mechanism underlying the anti-tumor effect of radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 115(1), 43-50. doi: 10.1007/s10549-008-0044-z
- Lonergan, T., Bavister, B., & Brenner, C. (2007). Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*, 7(5), 289-296. doi: 10.1016/j.mito.2007.05.002
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605-623.
- Loven, M. A., Davis, R. E., Curtis, C. D., Muster, N., Yates, J. R., & Nardulli, A. M. (2004). A novel estrogen receptor alpha-associated protein alters receptor-deoxyribonucleic acid interactions and represses receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*, 18(11), 2649-2659. doi: 10.1210/me.2003-0195
- Lu, J., & Danielsen, M. (1998). Differential regulation of androgen and glucocorticoid receptors by retinoblastoma protein. *J Biol Chem*, 273(47), 31528-31533
- Luchetti, S., Bossers, K., Van de Bilt, S., Agrapart, V., Morales, R. R., Frajese, G. V., & Swaab, D. F. (2011). Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 32(11), 1964-1976. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.014
- Lukiw, W. J., Kruck, T. P., & McLachlan, D. R. (1987). Alterations in human linker histone-DNA binding in the presence of aluminum salts in vitro and in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 8(2), 291-301
- Madeira, M., Mattar, A., Logullo, A. F., Soares, F. A., & Gebrim, L. H. (2013). Estrogen receptor alpha/beta ratio and estrogen receptor beta as predictors of endocrine therapy responsiveness-a randomized neoadjuvant trial comparison between anastrozole and tamoxifen for the treatment of postmenopausal breast cancer. *BMC Cancer*, 13, 425. doi: 10.1186/1471-2407-13-425
- Malyala, A., Kelly, M. J., & Ronnekleiv, O. K. (2005). Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids*, 70(5-7), 397-406. doi: 10.1016/j.steroids.2005.03.004
- Manente, A. G., Valenti, D., Pinton, G., Jithesh, P. V., Daga, A., Rossi, L., Moro, L. (2013). Estrogen receptor beta activation impairs mitochondrial oxidative metabolism and affects malignant mesothelioma cell growth in vitro and in vivo. *Oncogenesis*, 2, e72. doi: 10.1038/onesis.2013.32
- Mannella, P., & Brinton, R. D. (2006). Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action. *J Neurosci*, 26(37), 9439-9447. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1443-06.2006

- Marino, M., Acconcia, F., & Ascenzi, P. (2005). Estrogen receptor signalling: bases for drug actions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5(3), 305-314
- Marino, M., Acconcia, F., Bresciani, F., Weisz, A., & Trentalance, A. (2002). Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell*, 13(10), 3720-3729. doi: 10.1091/mbc.E02-03-0153
- Marino, M., Acconcia, F., & Trentalance, A. (2003). Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells. *Mol Biol Cell*, 14(6), 2583-2591. doi: 10.1091/mbc.E02-09-0621
- Marino, M., Ficca, R., Ascenzi, P., & Trentalance, A. (2001). Nitric oxide inhibits selectively the 17beta-estradiol-induced gene expression without affecting nongenomic events in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(3), 529-533. doi: 10.1006/bbrc.2001.5433
- Marino, M., Galluzzo, P., Leone, S., Acconcia, F., & Ascenzi, P. (2006). Nitric oxide impairs the 17beta-estradiol-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*, 13(2), 559-569. doi: 10.1677/erc.1.01106
- Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A., & Freedman, M. L. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 150(1), 40-44. doi: 10.1006/exnr.1997.6750
- Maroney, A. C., Glicksman, M. A., Basma, A. N., Walton, K. M., Knight, E., Jr., Murphy, C. A., Dionne, C. A. (1998). Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J Neurosci*, 18(1), 104-111
- Marsaud, V., Gougelet, A., Maillard, S., & Renoir, J. M. (2003). Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 17(10), 2013-2027. doi: 10.1210/me.2002-0269
- Martinez-Outschoorn, U. E., Goldberg, A., Lin, Z., Ko, Y. H., Flomenberg, N., Wang, C., Lisanti, M. P. (2011). Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 12(10), 924-938. doi: 10.4161/cbt.12.10.17780
- Martinez-Outschoorn, U. E., Pavlides, S., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2011). Mitochondrial biogenesis drives tumor cell proliferation. *Am J Pathol*, 178(5), 1949-1952. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.002
- Masuihiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Kato, S. (2005). Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(23), 8126-8131. doi: 10.1073/pnas.0503197102
- Masuyama, H., & Hiramatsu, Y. (2004). Involvement of suppressor for Gal 1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors. *J Biol Chem*, 279(13), 12020-12026. doi: 10.1074/jbc.M312762200
- Matthews, J., & Gustafsson, J. A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 3(5), 281-292. doi: 10.1124/mi.3.5.281
- Mattingly, K. A., Ivanova, M. M., Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Barch, M. J., & Klinge, C. M. (2008). Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol Endocrinol*, 22(3), 609-622. doi: 10.1210/me.2007-0029
- Maya, S., Prakash, T., Madhu, K. D., & Goli, D. (2016). Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomed Pharmacother*, 83, 746-754. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.035
- McEwen, B. S., & Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, 20(3), 279-307. doi: 10.1210/edrv.20.3.0365
- Medway, C., Combarros, O., Cortina-Borja, M., Butler, H. T., Ibrahim-Verbaas, C. A., de Bruijn, R. F., Lehmann, D. J. (2014). The sex-specific associations of the aromatase

- gene with Alzheimer's disease and its interaction with IL10 in the Epistasis Project. *Eur J Hum Genet*, 22(2), 216-220. doi: 10.1038/ejhg.2013.116
- Mendez, P., & Garcia-Segura, L. M. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology*, 147(6), 3027-3039. doi: 10.1210/en.2005-1224
- Mendez-Lucas, A., Hyrossova, P., Novellademunt, L., Vinals, F., & Perales, J. C. (2014). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *J Biol Chem*, 289(32), 22090-22102. doi: 10.1074/jbc.M114.566927
- Meyer, T. E., & Habener, J. F. (1993). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev*, 14(3), 269-290. doi: 10.1210/edrv-14-3-269
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 11(3), 577-590
- Milner, T. A., Ayoola, K., Drake, C. T., Herrick, S. P., Tabori, N. E., McEwen, B. S., Alves, S. E. (2005). Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 491(2), 81-95. doi: 10.1002/cne.20724
- Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Willson, T. M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(1), 75-78. doi: 10.1006/bbrc.1998.8738
- Moorthy, K., Sharma, D., Basir, S. F., & Baquer, N. Z. (2005). Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Exp Gerontol*, 40(4), 295-302. doi: 10.1016/j.exger.2005.01.004
- Moos, T., & Morgan, E. H. (2000). Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol*, 20(1), 77-95
- Morrish, F., Giedt, C., & Hockenbery, D. (2003). c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev*, 17(2), 240-255. doi: 10.1101/gad.1032503
- Murphy, E. (2011). Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res*, 109(6), 687-696. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236687
- Nawaz, Z., Lonard, D. M., Dennis, A. P., Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 1858-1862
- Nawaz, Z., Stancel, G. M., & Hyder, S. M. (1999). The pure antiestrogen ICI 182,780 inhibits progesterin-induced transcription. *Cancer Res*, 59(2), 372-376
- Nedzvetsky, V. S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A. A., & Baydas, G. (2006). Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochemistry (Mosc)*, 71(3), 239-244
- Nilsen, J., & Brinton, R. D. (2004). Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3(4), 297-313.
- Nilsen, J., & Diaz Brinton, R. (2003). Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5), 2842-2847. doi: 10.1073/pnas.0438041100
- Nilsen, J., Irwin, R. W., Gallaher, T. K., & Brinton, R. D. (2007). Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *J Neurosci*, 27(51), 14069-14077. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4391-07.2007
- Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (2011). Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*, 89(1), 44-55. doi: 10.1038/clpt.2010.226
- Nunez, A. M., Jakowlev, S., Briand, J. P., Gaire, M., Krust, A., Rio, M. C., & Chambon, P. (1987). Characterization of the estrogen-induced pS2 protein secreted by the human



- breast cancer cell line MCF-7. *Endocrinology*, 121(5), 1759-1765. doi: 10.1210/endo-121-5-1759
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., & Smith, M. A. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 19(6), 1959-1964
- O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K., & Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*, 18(8), 1859-1875. doi: 10.1210/me.2003-0044
- O'Lone, R., Knorr, K., Jaffe, I. Z., Schaffer, M. E., Martini, P. G., Karas, R. H., Hansen, U. (2007). Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol*, 21(6), 1281-1296. doi: 10.1210/me.2006-0497
- O'Malley, B. W. (2005). A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol*, 19(6), 1402-1411. doi: 10.1210/me.2004-0480
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., & Muramatsu, M. (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*, 26(15), 3505-3512.
- Ohyashiki, T., Suzuki, S., Satoh, E., & Uemori, Y. (1998). A marked stimulation of Fe<sup>2+</sup>-initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by a lipophilic aluminum complex, aluminum acetylacetonate. *Biochim Biophys Acta*, 1389(2), 141-149
- Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y. S., Matsuda, N. (2010). p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells*, 15(8), 887-900. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x
- Osborne, C. K., Wakeling, A., & Nicholson, R. I. (2004). Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*, 90 Suppl 1, S2-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6601629
- Overk, C. R., Lu, P. Y., Wang, Y. T., Choi, J., Shaw, J. W., Thatcher, G. R., & Mufson, E. J. (2012). Effects of aromatase inhibition versus gonadectomy on hippocampal complex amyloid pathology in triple transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 45(1), 479-487. doi: 10.1016/j.nbd.2011.08.035
- Paeck, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., & Scanlan, T. S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 277(5331), 1508-1510
- Parihar, M. S., & Brewer, G. J. (2007). Mitochondrial failure in Alzheimer disease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1), C8-23. doi: 10.1152/ajpcell.00232.2006
- Park, O. J. (2004). Comparison of estrogen and genistein in their antigenotoxic effects, apoptosis and signal transduction protein expression patterns. *Biofactors*, 21(1-4), 379-382
- Pearce, S. T., & Jordan, V. C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 50(1), 3-22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.003
- Peeters, P. H., Keinan-Boker, L., van der Schouw, Y. T., & Grobbee, D. E. (2003). Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat*, 77(2), 171-183
- Penot, G., Le Peron, C., Merot, Y., Grimaud-Fanouillere, E., Ferriere, F., Boujrad, N., Flouriot, G. (2005). The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 146(12), 5474-5484. doi: 10.1210/en.2005-0866
- Perez-Alvarez, M. J., Maza Mdel, C., Anton, M., Ordonez, L., & Wandosell, F. (2012). Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *J Neuroinflammation*, 9, 157. doi: 10.1186/1742-2094-9-157

- Perillo, B., Sasso, A., Abbondanza, C., & Palumbo, G. (2000). 17 $\beta$ -estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol*, 20(8), 2890-2901
- Peterson, R. S., Lee, D. W., Fernando, G., & Schlinger, B. A. (2004). Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. *J Comp Neurol*, 475(2), 261-269. doi: 10.1002/cne.20157
- Pieczenik, S. R., & Neustadt, J. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, 83(1), 84-92. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.09.008
- Pietranera, L., Bellini, M. J., Arevalo, M. A., Goya, R., Brocca, M. E., Garcia-Segura, L. M., & De Nicola, A. F. (2011). Increased aromatase expression in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats: effects of estradiol administration. *Neuroscience*, 174, 151-159. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.044
- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Carlquist, M. (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*, 18(17), 4608-4618. doi: 10.1093/emboj/18.17.4608
- Pink, J. J., Wu, S. Q., Wolf, D. M., Bilimoria, M. M., & Jordan, V. C. (1996). A novel 80 kDa human estrogen receptor containing a duplication of exons 6 and 7. *Nucleic Acids Res*, 24(5), 962-969
- Planey, S. L., Kumar, R., & Arnott, J. A. (2014). Estrogen receptors (ER $\alpha$  versus ER $\beta$ ): friends or foes in human biology? *J Recept Signal Transduct Res*, 34(1), 1-5. doi: 10.3109/10799893.2013.853188
- Ponglikitmongkol, M., Green, S., & Chambon, P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J*, 7(11), 3385-3388
- Poola, I., Abraham, J., & Baldwin, K. (2002). Identification of ten exon deleted ER $\beta$  mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor beta mRNA is distinct from that of estrogen receptor alpha. *FEBS Lett*, 516(1-3), 133-138
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., & Safe, S. (1997). Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, 11(11), 1569-1580. doi: 10.1210/mend.11.11.9916
- Powell, J. J., Whitehead, M. W., Ainley, C. C., Kendall, M. D., Nicholson, J. K., & Thompson, R. P. (1999). Dietary minerals in the gastrointestinal tract: hydroxypolymerisation of aluminium is regulated by luminal mucins. *J Inorg Biochem*, 75(3), 167-180
- Prall, O. W., Sarcevic, B., Musgrove, E. A., Watts, C. K., & Sutherland, R. L. (1997). Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem*, 272(16), 10882-10894.
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., & Rune, G. M. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13(2), 226-234. doi: 10.1002/hipo.10075
- Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Perjesi, P., Zharikova, A. D., Perez, E. J., Liu, R., & Simpkins, J. W. (2003). Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11741-11746. doi: 10.1073/pnas.2032621100
- Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta*, 1783(1), 1-11. doi: 10.1016/j.bbamer.2007.10.021
- Raap, D. K., DonCarlos, L., Garcia, F., Muma, N. A., Wolf, W. A., Battaglia, G., & Van de Kar, L. D. (2000). Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology*, 39(10), 1823-1832

- Raffetto, J. D., Leverkus, M., Park, H. Y., & Menzoian, J. O. (2001). Synopsis on cellular senescence and apoptosis. *J Vasc Surg*, 34(1), 173-177. doi: 10.1067/mva.2001.115964
- Rao, R., & Wiechmann, L. (2009). Treatment of early breast cancer. *Minerva Endocrinol*, 34(4), 311-324
- Rao, K. S., Rao, B. S., Vishnuvardhan, D., & Prasad, K. V. (1993). Alteration of superhelical state of DNA by aluminium (Al). *Biochim Biophys Acta*, 1172(1-2), 17-20
- Rao, A. K., Ziegler, Y. S., McLeod, I. X., Yates, J. R., & Nardulli, A. M. (2009). Thioredoxin and thioredoxin reductase influence estrogen receptor alpha-mediated gene expression in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*, 43(6), 251-261. doi: 10.1677/JME-09-0053
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., & Levin, E. R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, 13(2), 307-319. doi: 10.1210/mend.13.2.0239
- Razandi, M., Pedram, A., & Levin, E. R. (2000). Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol*, 14(9), 1434-1447. doi: 10.1210/mend.14.9.0526
- Regnstrom, K., Ragnarsson, E. G., Rydell, N., Sjöholm, I., & Artursson, P. (2002). Tetanus antigen modulates the gene expression profile of aluminum phosphate adjuvant in spleen lymphocytes in vivo. *Pharmacogenomics J*, 2(1), 57-64
- Reid, G., Denger, S., Kos, M., & Gannon, F. (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci*, 59(5), 821-831
- Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*, 116(Pt 4), 585-586
- Rochira, V., Kara, E., & Carani, C. (2015). The endocrine role of estrogens on human male skeleton. *Int J Endocrinol*, 2015, 165215. doi: 10.1155/2015/165215
- Rosario, G. X., D'Souza, S. J., Manjramkar, D. D., Parmar, V., Puri, C. P., & Sachdeva, G. (2008). Endometrial modifications during early pregnancy in bonnet monkeys (*Macaca radiata*). *Reprod Fertil Dev*, 20(2), 281-294
- Ruddy, S. C., Lau, R., Cabrita, M. A., McGregor, C., McKay, B. C., Murphy, L. C., . . . Pratt, M. A. (2014). Preferential estrogen receptor beta ligands reduce Bcl-2 expression in hormone-resistant breast cancer cells to increase autophagy. *Mol Cancer Ther*, 13(7), 1882-1893. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-1066
- Ruiz-Larrea, B., Leal, A., Martin, C., Martinez, R., & Lacort, M. (1995). Effects of estrogens on the redox chemistry of iron: a possible mechanism of the antioxidant action of estrogens. *Steroids*, 60(11), 780-783
- Ruy, H., Lee, J., Ipme, S., Ratan, R., Ferrante, R. (2005). Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of mitochondrial genome in neurons. *PNAS*, 102 (39) 13915-13920
- Sana, M., & Malik, H. J. (2015). Current and emerging breast cancer biomarkers. *J Cancer Res Ther*, 11(3), 508-513. doi: 10.4103/0973-1482.163698
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N. D., & Moll, U. M. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett*, 488(3), 110-115
- Sarkar, S. N., Huang, R. Q., Logan, S. M., Yi, K. D., Dillon, G. H., & Simpkins, J. W. (2008). Estrogens directly potentiate neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 15148-15153. doi: 10.1073/pnas.0802379105
- Sausville, E., Carney, D., & Battey, J. (1985). The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J Biol Chem*, 260(18), 10236-10241.
- Savory, J., Herman, M. M., & Ghribi, O. (2003). Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *J Inorg Biochem*, 97(1), 151-154

- Sayeed, A., Konduri, S. D., Liu, W., Bansal, S., Li, F., & Das, G. M. (2007). Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional repression: implications for the regulation of apoptosis. *Cancer Res*, 67(16), 7746-7755. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3724
- Sayre, L. M., Autilio-Gambetti, L., & Gambetti, P. (1985). Pathogenesis of experimental giant neurofilamentous axonopathies: a unified hypothesis based on chemical modification of neurofilaments. *Brain Res*, 357(1), 69-83
- Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1576(1-2), 1-14
- Scarpulla, R. C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*, 97(4), 673-683. doi: 10.1002/jcb.20743
- Scheubel, R. J., Bartling, B., Simm, A., Silber, R. E., Drogaris, K., Darmer, D., & Holtz, J. (2002). Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol*, 39(3), 481-488
- Schmidt, A. J., Krieg, J., & Vedder, H. (2002). Differential effects of glucocorticoids and gonadal steroids on glutathione levels in neuronal and glial cell systems. *J Neurosci Res*, 67(4), 544-550. doi: 10.1002/jnr.10146
- Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., & Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75(3), 567-578
- Scott, E., Zhang, Q. G., Wang, R., Vadlamudi, R., & Brann, D. (2012). Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front Neuroendocrinol*, 33(1), 85-104. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.10.001
- Sehara, Y., Sawicka, K., Hwang, J. Y., Latuszczek-Barrantes, A., Etgen, A. M., & Zukin, R. S. (2013). Survivin Is a transcriptional target of STAT3 critical to estradiol neuroprotection in global ischemia. *J Neurosci*, 33(30), 12364-12374. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1852-13.2013
- Seifart, K. H., & Sekeris, C. E. (1969). Alpha-amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA-polymerase. *Z Naturforsch B*, 24(12), 1538-1544
- Seira, O., & Del Rio, J. A. (2014). Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3beta) at the tip of neuronal development and regeneration. *Mol Neurobiol*, 49(2), 931-944. doi: 10.1007/s12035-013-8571-y
- Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M. C., & Corbo, L. (2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*, 19(11), 2671-2684. doi: 10.1210/me.2005-0042
- Sever, R., & Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(3), a016709. doi: 10.1101/cshperspect.a016709
- Shao, W., Keeton, E. K., McDonnell, D. P., & Brown, M. (2004). Coactivator AIB1 links estrogen receptor transcriptional activity and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32), 11599-11604. doi: 10.1073/pnas.0402997101
- Sherwin, B. B. (2003). Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev*, 24(2), 133-151. doi: 10.1210/er.2001-0016
- Shi, B., & Haug, A. (1990). Aluminum uptake by neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 55(2), 551-558
- Shin, J. H., Hur, J. Y., Seo, H. S., Jeong, Y. A., Lee, J. K., Oh, M. J., Kim, S. H. (2007). The ratio of estrogen receptor alpha to estrogen receptor beta in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 72(6-7), 592-599. doi: 10.1016/j.steroids.2007.03.013
- Shivakumar, B. R., Kolluri, S. V., & Ravindranath, V. (1995). Glutathione and protein thiol homeostasis in brain during reperfusion after cerebral ischemia. *J Pharmacol Exp Ther*, 274(3), 1167-1173
- Sierra, A., Lavaque, E., Perez-Martin, M., Azcoitia, I., Hales, D. B., & Garcia-Segura, L. M. (2003). Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution,

- developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci*, 18(6), 1458-1467
- Simpkins, J. W., Yang, S. H., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008). Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol*, 290(1-2), 51-59. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.013
- Simpkins, J. W., Singh, M., Brock, C., & Etgen, A. M. (2012). Neuroprotection and estrogen receptors. *Neuroendocrinology*, 96(2), 119-130. doi: 10.1159/000338409
- Simpson, I. A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K. H., Travis, A., & Vannucci, S. J. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(2), E242-253. doi: 10.1152/ajpendo.90388.2008
- Singh, M., Setalo, G., Jr., Guan, X., Frail, D. E., & Toran-Allerand, C. D. (2000). Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J Neurosci*, 20(5), 1694-1700.
- Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*, 25(1), 45-71. doi: 10.1210/er.2003-0023
- Song, R. X., Zhang, Z., & Santen, R. J. (2005). Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab*, 16(8), 347-353. doi: 10.1016/j.tem.2005.06.010
- Soni, M. G., White, S. M., Flamm, W. G., & Burdock, G. A. (2001). Safety evaluation of dietary aluminum. *Regul Toxicol Pharmacol*, 33(1), 66-79. doi: 10.1006/rtp.2000.1441
- Sotoca, A. M., van den Berg, H., Vervoort, J., van der Saag, P., Strom, A., Gustafsson, J. A., . . . Murk, A. J. (2008). Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicol Sci*, 105(2), 303-311. doi: 10.1093/toxsci/kfn141
- Spence, R. D., Wisdom, A. J., Cao, Y., Hill, H. M., Mongerson, C. R., Stapornkul, B., Voskuhl, R. R. (2013). Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ERalpha signaling on astrocytes but not through ERbeta signaling on astrocytes or neurons. *J Neurosci*, 33(26), 10924-10933. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0886-13.2013
- Stanic, D., Dubois, S., Chua, H. K., Tonge, B., Rinehart, N., Horne, M. K., & Boon, W. C. (2014). Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors alpha and beta, and androgen receptors. *PLoS One*, 9(3), e90451. doi: 10.1371/journal.pone.0090451
- Sutherland, J. E., & Greger, J. L. (1998). Effect of the size of an oral dose of aluminium on the relative importance of biliary v. urinary aluminium excretion in conscious rats. *Food Chem Toxicol*, 36(6), 505-512
- Sutherland, R. L., Hamilton, J. A., Sweeney, K. J., Watts, C. K., & Musgrove, E. A. (1995). Expression and regulation of cyclin genes in breast cancer. *Acta Oncol*, 34(5), 651-656
- Tang, H., Zhang, Q., Yang, L., Dong, Y., Khan, M., Yang, F., Wang, R. (2014). GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol*, 387(1-2), 52-58. doi: 10.1016/j.mce.2014.01.024
- Tang, L. H., & Aizenman, E. (1993). Allosteric modulation of the NMDA receptor by dihydrolipoic and lipoic acid in rat cortical neurons in vitro. *Neuron*, 11(5), 857-863
- Taupeau, C., Poupon, J., Treton, D., Brosse, A., Richard, Y., & Machelon, V. (2003). Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol Reprod*, 68(6), 1982-1988. doi: 10.1095/biolreprod.102.009894
- Taylor, G. A., Moore, P. B., Ferrier, I. N., Tyrer, S. P., & Edwardson, J. A. (1998). Gastrointestinal absorption of aluminium and citrate in man. *J Inorg Biochem*, 69(3), 165-169

- Telci, A., Cakatay, U., Akhan, S. E., Bilgin, M. E., Turfanda, A., & Sivas, A. (2002). Postmenopausal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage. *Gynecol Obstet Invest*, 54(2), 88-93. doi: 10.1159/000067718
- Tergaonkar, V., Pando, M., Vafa, O., Wahl, G., & Verma, I. (2002). p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*, 1(5), 493-503
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., & Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, 59(3), 477-487
- Trecek, O., Juhasz-Boess, I., Latrich, C., Horn, F., Goerse, R., & Ortmann, O. (2008). Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 110(3), 507-520. doi: 10.1007/s10549-007-9749-7
- Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F., & Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell*, 3(4), 513-519
- Valley, C. C., Metivier, R., Solodin, N. M., Fowler, A. M., Mashek, M. T., Hill, L., & Alarid, E. T. (2005). Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus. *Mol Cell Biol*, 25(13), 5417-5428. doi: 10.1128/MCB.25.13.5417-5428.2005
- Varea, O., Garrido, J. J., Dopazo, A., Mendez, P., Garcia-Segura, L. M., & Wandosell, F. (2009). Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons. *PLoS One*, 4(4), e5153. doi: 10.1371/journal.pone.0005153
- Velours, J., Paumard, P., Soubannier, V., Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., & Graves, P. V. (2000). Organisation of the yeast ATP synthase F(0): a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. *Biochim Biophys Acta*, 1458(2-3), 443-456
- Vina, J., Borras, C., Gambini, J., Sastre, J., & Pallardo, F. V. (2005). Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett*, 579(12), 2541-2545. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.090
- Wade, C. B., & Dorsa, D. M. (2003). Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*, 144(3), 832-838. doi: 10.1210/en.2002-220899
- Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., & Del Sal, G. (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, 33(11), 2007-2017. doi: 10.1093/carcin/bgs232
- Walker, P., Germond, J. E., Brown-Luedi, M., Givel, F., & Wahli, W. (1984). Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and apo-VLDLII genes. *Nucleic Acids Res*, 12(22), 8611-8626
- Walker, V. R., Sutton, R. A., Meirav, O., Sossi, V., Johnson, R., Klein, J., Middleton, R. (1994). Tissue disposition of 26aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry. *Clin Invest Med*, 17(5), 420-425
- Walton, J. R. (2010). Evidence for participation of aluminum in neurofibrillary tangle formation and growth in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 22(1), 65-72. doi: 10.3233/JAD-2010-100486
- Walton, J. R. (2012). Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 29(2), 255-273. doi: 10.3233/JAD-2011-111712
- Wang, J., Silva, J. P., Gustafsson, C. M., Rustin, P., & Larsson, N. G. (2001). Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(7), 4038-4043. doi: 10.1073/pnas.061038798

- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y., & Deuel, T. F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(4), 1023-1027. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.226
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y., & Deuel, T. F. (2006). A variant of estrogen receptor- $\{\alpha\}$ , hER- $\{\alpha\}$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9063-9068. doi: 10.1073/pnas.0603339103
- Wang, C., Mayer, J. A., Mazumdar, A., Fertuck, K., Kim, H., Brown, M., & Brown, P. H. (2011). Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Mol Endocrinol*, 25(9), 1527-1538. doi: 10.1210/me.2011-1037
- Warnmark, A., Wikstrom, A., Wright, A. P., Gustafsson, J. A., & Hard, T. (2001). The N-terminal regions of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *J Biol Chem*, 276(49), 45939-45944. doi: 10.1074/jbc.M107875200
- Watters, J. J., & Dorsa, D. M. (1998). Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms. *J Neurosci*, 18(17), 6672-6680
- Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E. R., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2003). Update on estrogen signaling. *FEBS Lett*, 546(1), 17-24
- Wilson, V. S., Bobseine, K., & Gray, L. E., Jr. (2004). Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol Sci*, 81(1), 69-77. doi: 10.1093/toxsci/kfh180
- Winterle, J. S., Mill, T., Harris, T., & Goldbeck, R. A. (2001). Absolute kinetic characterization of 17- $\beta$ -estradiol as a radical-scavenging, antioxidant synergist. *Arch Biochem Biophys*, 392(2), 233-244. doi: 10.1006/abbi.2001.2431
- Wood, J. R., Likhite, V. S., Loven, M. A., & Nardulli, A. M. (2001). Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*, 15(7), 1114-1126. doi: 10.1210/mend.15.7.0671
- Woolley, C. S. (1999). Effects of estrogen in the CNS. *Curr Opin Neurobiol*, 9(3), 349-354
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 441-469. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.002301
- Yakimchuk, K., Jondal, M., & Okret, S. (2013). Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in the normal immune system and in lymphoid malignancies. *Mol Cell Endocrinol*, 375(1-2), 121-129. doi: 10.1016/j.mce.2013.05.016
- Yamakawa, K., & Arita, J. (2004). Cross-talk between the estrogen receptor-, protein kinase A-, and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling pathways in the regulation of lactotroph proliferation in primary culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 88(2), 123-130. doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.11.003
- Yamashita, H., Nishio, M., Kobayashi, S., Ando, Y., Sugiura, H., Zhang, Z., Iwase, H. (2005). Phosphorylation of estrogen receptor  $\alpha$  serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 7(5), R753-764. doi: 10.1186/bcr1285
- Yang, E. Y., Guo-Ross, S. X., & Bondy, S. C. (1999). The stabilization of ferrous iron by a toxic  $\beta$ -amyloid fragment and by an aluminum salt. *Brain Res*, 839(2), 221-226.
- Yang, J., Singleton, D. W., Shaughnessy, E. A., & Khan, S. A. (2008). The F-domain of estrogen receptor- $\alpha$  inhibits ligand induced receptor dimerization. *Mol Cell Endocrinol*, 295(1-2), 94-100. doi: 10.1016/j.mce.2008.08.001
- Yang, L. C., Zhang, Q. G., Zhou, C. F., Yang, F., Zhang, Y. D., Wang, R. M., & Brann, D. W. (2010). Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *PLoS One*, 5(5), e9851. doi: 10.1371/journal.pone.0009851

- Yang, S. H., Liu, R., Perez, E. J., Wen, Y., Stevens, S. M., Jr., Valencia, T., Simpkins, J. W. (2004). Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(12), 4130-4135. doi: 10.1073/pnas.0306948101
- Yang, S. H., Sarkar, S. N., Liu, R., Perez, E. J., Wang, X., Wen, Y., Simpkins, J. W. (2009). Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *J Biol Chem*, 284(14), 9540-9548. doi: 10.1074/jbc.M808246200
- Yao, M., Nguyen, T. V., & Pike, C. J. (2007). Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci*, 27(6), 1422-1433. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2382-06.2007
- Yi, P., Driscoll, M. D., Huang, J., Bhagat, S., Hilf, R., Bambara, R. A., & Muyan, M. (2002). The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta. *Mol Endocrinol*, 16(4), 674-693. doi: 10.1210/mend.16.4.0810
- Yogev, O., & Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim Biophys Acta*, 1808(3), 1012-1020. doi: 10.1016/j.bbame.2010.07.004
- Yokel, R. A. (2002). Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environ Health Perspect*, 110 Suppl 5, 699-704
- Yokel, R. A., & McNamara, P. J. (2001). Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol Toxicol*, 88(4), 159-167
- Yokel, R. A., & O'Callaghan, J. P. (1998). An aluminum-induced increase in GFAP is attenuated by some chelators. *Neurotoxicol Teratol*, 20(1), 55-60.
- Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 23(22), 8137-8151.
- Zhang, J., Hu, X., & Lazar, M. A. (1999). A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol Cell Biol*, 19(9), 6448-6457
- Zhang, Q. G., Raz, L., Wang, R., Han, D., De Sevilla, L., Yang, F., Brann, D. W. (2009). Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J Neurosci*, 29(44), 13823-13836. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-09.2009
- Zhang, Q. G., Wang, R., Tang, H., Dong, Y., Chan, A., Sareddy, G. R., Brann, D. W. (2014). Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol*, 389(1-2), 84-91. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.019
- Zhao, L., & Brinton, R. D. (2007). Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res*, 1172, 48-59. doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.092
- Zhao, L., Wu, T. W., & Brinton, R. D. (2004). Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res*, 1010(1-2), 22-34. doi: 10.1016/j.brainres.2004.02.066
- Zhou, Y., Watters, J. J., & Dorsa, D. M. (1996). Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology*, 137(5), 2163-2166. doi: 10.1210/endo.137.5.8612562

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), (2014). opinion on the safety of aluminium in cosmetic products

Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice. (2007). Chapter 5

Εμμανουήλ Ξυδάκης, Μάρτιος 2007 Αθήνα, Κλινική Ογκολογία, Κεφ. 7, Οιστρογόνα και καρκίνος του μαστού



## Δημοσιεύσεις

### Δημοσιεύσεις στο επιστημονικό πεδίο της διδακτορικής διατριβής

**Gorgogietas, V.A.**, Tsialtas, I., Sotiriou, N., Laschou, V., Karra, A., Leonidas, D.D., Chrousos, G., Protopapa, E., Psarra, A.M. (2018). Potential interference of aluminum chlorohydrate with estrogen receptor signalling in breast cancer cells. *J. Mol. Biochem*, 7: 1-13

**Gorgogietas, V.A.**, et al. Neurotoxic effects of aluminum is possibly associated with its estrogenic activity. (υπό συγγραφή)

### Δημοσιεύσεις σε συναφή επιστημονικά πεδία

Anifandis, G., Amiridis, **Gorgogietas, V.A.**, G., Dafopoulos, K., Daponte, A., Dovolou, E., Gavriil, E., Psarra, A. G. (2017). The In Vitro Impact of the Herbicide Roundup on Human Sperm Motility and Sperm Mitochondria. *Toxics*, 6(1). doi: 10.3390/toxics6010002

Georgatza, D., **Gorgogietas, V. A.**, Kylindri, P., Charalambous, M. C., Papadopoulou, K. K., Hayes, J. M., & Psarra, A. G. (2016). The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists. *Int J Biochem Cell Biol*, 79, 277-287. doi: 10.1016/j.biocel.2016.08.028

Kantsadi, A. L., Apostolou, A., Theofanous, S., Stravodimos, G. A., Kyriakis, E., **Gorgogietas, V. A.**, Leonidas, D. D. (2014). Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol*, 67, 35-43. doi: 10.1016/j.fct.2014.01.055

Stravodimos, G. A., Kantsadi, A. L., Apostolou, A., Kyriakis, E., Kafaski-Kanelli, V. N., **Gorgogietas, V.A.**, Solovou, T., Leonidas, D. D. (2018). Affinity Crystallography Reveals the Bioactive Compounds of Industrial Juicing Byproducts of *Punica granatum* for Glycogen Phosphorylase. *Curr Drug Discov Technol*, 15(1), 41-53. doi: 10.2174/1570163814666170619091736

